

ALAN GUILHERME GONÇALVES

**MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM OLIGOSSACARÍDEOS  
DERIVADOS DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

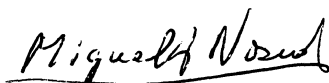
CURITIBA

2005

**ALAN GUILHERME GONÇALVES**

**MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM OLIGOSSACARÍDEOS  
DERIVADOS DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão examinadora formada pelos professores:



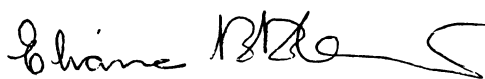
Dr. Miguel Daniel Nosedá  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



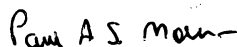
Dr. Philip Albert James Gorin  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr. Francisco de Assis Marques  
Departamento de Química – UFPR



Dra. Eliana Beleski Borba Carneiro  
Departamento de Química – UEPG



Dr. Paulo Antonio de Souza Mourão  
Departamento de Bioquímica – UFRJ

Curitiba, 27 de junho de 2005

**Orientador:**  
**Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá**

**Co-Orientador:**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eugênia Rabello Duarte**

Este trabalho foi parcialmente desenvolvido no Departamento de Química da Dalhousie University – Halifax – N.S. – Canadá, sob orientação do Prof. Dr. T. Bruce Grindley. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) financiou integralmente, em todos os aspectos, as atividades de pesquisa no exterior.



Dedico esta tese aos meus  
Pais, Alair Antônio Gonçalves  
e Vânia Maria dos Reis  
Gonçalves.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Jesus Cristo, à quem eu sigo.

À Minha Família: meus pais Vânia e Alair, minhas irmãs Ana Heloisa e Adriana, e minha sobrinha e afilhada Bruna. Sem sombras de dúvida, família é o que eu tenho de mais importante.

Ao Henrique, que tem sido o melhor amigo que alguém poderia ter.

Ao Miguel, que além de ter sido um excelente orientador, foi família e amigo, principalmente nos primeiros meses em que estive no Canadá realizando parte deste trabalho. Obrigado pela orientação indispensável e por confiar em mim, me dando a possibilidade de ter minhas próprias idéias e fazê-las dar certo.

À Professora Maria Eugênia, pela valiosa co-orientação e pelos conselhos nas horas das decisões difíceis.

Aos amigos do laboratório:

Ao super-amigo Adriano: obrigado por toda ajuda, amizade e paciência.

À Rosiane por todo companheirismo e por tudo que representou para mim.

Ao Diogo que, além de amigo, sempre foi meu parceiro de trabalho.

À Luciana; tenho muito orgulho de ter sido o primeiro a trabalhar com ela e tê-la ensinado o pouco que sei.

À Juliana pela amizade e apoio que me deu nas horas de alegria e de tristeza.

À Paula, que conquistou minha admiração com o passar do tempo e hoje em dia mora no meu coração (é... eu tenho um!!).

Ao Sérgio, pelos bons anos de convivência na graduação e na pós-graduação.

Ao Marco pela amizade e por estar sempre pronto a ajudar.

Aos mais novos; Robson, Reinaldo, Tayna e Franciely que demonstraram ser ótimas pessoas mesmo em um curto período de convivência.

À Sarah Ramer que foi uma das pessoas mais importantes na minha vida. Sem ela, não sei o que seria de mim enquanto estive afastado do Brasil e da minha família. Aos seus pais, Gord e Carol Ramer que fizeram, de modo fantástico, o papel de minha família naquele período. Ao seus amigos, Tom, Stacey, Mary e Mobin.

Aos excelentes amigos que fiz no Canadá. Aos brasileiros que lá conheci: Liliane, Luiz, João e Wilard. Aos canadenses: Barry, Aaron, Sunjoyo, Joe, Jason, Erin, Lisa, Lorie e Morgan.

Ao Professor T. Bruce Grindley e ao Departamento de Química da Dalhousie University por me acolherem em seus laboratórios. Aos colegas de trabalho que lá conheci: Hussein al Mughaid, Hong Liang, Tomas Tran, Roger White, Nustrat Jarhan, Erik Soarez, Bob Berno, Xiao Feng e Michael Lumdsen.

À Priscilla Hansaul, que foi minha companheira durante os anos da minha pós-graduação. Esta pessoa foi fundamental para minha felicidade naquele período. Muito obrigado por tudo, você é fantástica!!

Aos amigos do surf: ao amigão Murilo, ao Japa, ao Stefan, ao Alexandre Orsato, ao Luciano, ao Téo e ao Marcelo Ferro. Sem estes amigos, e sem o surf, iria ser muito difícil agüentar esta longa caminhada.

À Ana Paula Newton: sou um privilegiado por ter conhecido uma pessoa com tantas qualidades. Obrigado por tudo, minha "amiga eletrônica"!

Ao Rodrigo Vassoler e à Fernanda que sempre foram e serão grandes amigos. Muito obrigado pelos excelentes anos de convivência e por fazerem parte da minha vida.

Aos amigos da graduação: Pati Sassaki, Titi, Lu, Justine, Carlão e Adriano Bassani.

Aos companheiros do Departamento: Lauro, Rafael, Thales, Ricardo, Carol, Carol Galvão, Reis, Elaine, Leo, Giovana, Thiago, Valter, Gus, Ana Elena, Marcelo "Fumaça", Marcelão, Poliana, Andréa, a grande amiga Rose Adele.

Ao Professores Gorin e Guilherme por terem aceitado ser minha banca interna. O Guilherme sempre foi um grande amigo e ótimo conselheiro científico, obrigado por toda ajuda e companheirismo. Ao Professor Gorin, um agradecimento especial, pela ajuda no momento de conseguir minha bolsa para realização do Doutorado Sandwich e pelas correções referentes à língua inglesa, as quais sempre foram indispensáveis.

Aos membros da Comissão Examinadora de minha tese: Prof. Dr. Philip Albert James Gorin, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Beleski Borba Carneiro, Prof. Dr. Francisco de Assis Marques e Prof. Dr. Paulo Antônio de Souza Mourão.

Ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica.

As bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas que sempre estiveram prontas a ajudar.

Ao apoio financeiro do CNPq e PRONEX-Carboidratos.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. GALACTANAS DE ALGAS MARINHAS .....	1
1.2. OLIGOSSACARÍDEOS.....	5
1.2.1. Oligossacarídeos derivados de galactanas de algas vermelhas.....	7
1.3. ELETROFORESE CAPILAR.....	12
1.3.1. Fluxo eletroosmótico.....	13
1.3.2. Eletroforese capilar: separação de oligossacarídeos.....	16
1.4. SÍNTESE DE GLICOSÍDEOS.....	19
1.5. DERIVAÇÃO DE CARBOIDRATOS <i>via</i> ACETAIS DE DIALQUILESTANILENO.....	25
1.5.1. Correlação entre a estrutura de acetais de dialquilestanileno e regiosseletividade.....	27
1.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA DE GLICÍDEOS.....	31
1.7. CARBOIDRATOS SULFATADOS E ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	35
1.7.1. Carboidratos sulfatados: relação entre estrutura e atividade antiviral.....	35
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	42
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS.....	43
3.2. PRODUÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS.....	43
3.2.1. Hidrólise redutiva parcial.....	43
3.2.1. Hidrólise parcial.....	44
3.3. FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS.....	44
3.3.1. Cromatografia de troca iônica .....	44
3.3.2. Cromatografia de filtração em gel .....	44
3.3.3. Cromatografia em sílica.....	44
3.3.4. Extração dos oligossacarídeos com dimetilsulfóxido.....	45
3.3.5. Purificação do produto de hidrólise redutiva parcial com uso de solventes orgânicos.....	45
3.4. ELETROFORESE CAPILAR.....	45
3.5. SÍNTESE E MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS METIL GALACTOSÍDEOS.....	46
3.5.1. Preparação do $\beta$ -D-Galp pentaacetato.....	46
3.5.2. Preparação de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-bromo- $\alpha$ -D-Galp.....	47
3.5.3. Preparação de Me 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-Galp.....	47
3.5.4. Preparação de Me $\beta$ -D-Galp.....	48
3.5.5. Preparação de Me 6-O- <i>tert</i> -butildimetilsilil- $\beta$ -D-Galp.....	48
3.5.6. Preparação de Me 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp.....	48
3.5.7. Preparação de Me 6-O-tosil- $\beta$ -D-Galp.....	49
3.5.8. Método geral para as reações de alquilações regioseletivas para preparação dos compostos Me 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp; Me 3,6-di-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp; Me 3-O-dodecil- $\beta$ -D-Galp; Me 3,6-di-O-dodecil- $\beta$ -D-Galp; Me 3-O-decil- $\beta$ -D-Galp; Me 3,6-di-O-decil- $\beta$ -D-Galp; Me 3-O-tetradecil-6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp.....	49
3.5.9. Método para a reação de sulfatação regioseletiva para preparação do composto Me 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp 6-sulfato, sal sódico.....	50

3.6. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS.....	50
3.6.1. Preparação de $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH e 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH.....	50
3.6.2. Preparação de $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH.....	51
3.6.3. Preparação de $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH.....	51
3.6.4. Preparação de 3-O-tetradecil-6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH.....	52
3.6.5. Preparação de 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH, sal sódico.....	52
3.6.6. Preparação de 3-O-tetradecil-D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH .....	53
3.6.7. Preparação de $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH, sal sódico.....	53
3.6.8. Preparação de $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH, sal sódico.....	53
3.6.9. Sulfatação de 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH .....	54
3.6.10. Preparação de $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-D-GalOH.....	55
3.7. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	55
3.7.1. Aspectos gerais e técnicas de ressonância magnética nuclear monodimensionais.....	55
3.7.2 Técnicas de ressonância magnética nuclear bidimensionais.....	56
3.7.2.1. COSY .....	56
3.7.2.2. TOCSY.....	57
3.7.2.3. HMQC.....	57

3.7.2.4. HSQC.....	57
3.7.2.5. HMBC.....	58
3.8. IONIZAÇÃO POR SPRAY DE ELÉTRONS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (ESIMS).....	58
3.9. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	59
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
4.1. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS.....	60
4.2. OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL (HRP).....	62
4.2.1. Oligossacarídeos provenientes da agarana piruvilada e sulfatada ( <i>Acanthophora spicifera</i> ).....	63
4.2.2. Oligossacarídeos provenientes de <i>kappa</i> -carragenana ( <i>Kappaphycus alvarezii</i> ).....	68
4.2.3. Oligossacarídeos provenientes de <i>theta</i> -carragenana ( <i>Gigartina skottsbergii</i> ).....	72
4.2.4. Oligossacarídeo proveniente de agarose 6-sulfato ( <i>Gracilaria domingensis</i> ).....	76
4.2.5. Discussão comparativa da HRP das diferentes galactanas sulfatadas estudadas.....	78
4.2.6. HRP da agarose neutra comercial.....	80
4.3. HIDRÓLISE PARCIAL COM HCl.....	82
4.3.1. Oligossacarídeo proveniente de agarose comercial.....	82
4.4. ESTUDO DE OLIGOSSACARÍDEOS ISÔMEROS DE POSIÇÃO DE GRUPOS SULFATO POR DISSOCIAÇÃO INDUZIDA POR COLISÃO (CID) - ESIMS/MS.....	85
4.5. ELETROFORESE CAPILAR.....	90
4.5.1. Análise de curvas de hidrólise por EC.....	105



4.6. DERIVAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS.....	111
4.6.1. Modificações químicas em metil galactopiranosídeos.....	111
4.6.1.1. Síntese do Me $\beta$ -D-Galp.....	111
4.6.2. Grupos de bloqueio para OH-6 do Me $\beta$ -D-Galp (5).....	116
4.6.3. Alquilação regioseletiva dos metilgalactosídeos <i>via</i> acetais dibutilestanileno.....	119
4.6.4. Sulfatação regioseletiva do composto 5b <i>via</i> acetal de dibutilestanileno.....	125
4.6.5. Estudo dos acetais de dibutilestanileno por RMN de $^{119}\text{Sn}$ .....	126
4.6.6. Modificações químicas dos oligossacarídeos alditóis.....	136
4.8. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-HSV DOS GLICOSÍDEOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS.....	140
 5. CONCLUSÕES.....	 143
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	 148

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura básica repetitiva de carragenanas e agaranas.....	2
<b>Figura 2:</b> Obtenção de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)-agarobiose dimetilacetal a partir de uma agarana com acetal de ácido pirúvico ligado, via metanólise parcial .....	8
<b>Figura 3:</b> Formação de neoagarotetraose, neoagarohexaose, agarotetraose e agarohexaose .....	9
<b>Figura 4:</b> Oligossacarídeos alditóis obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas. Estruturas publicadas até o ano de 2002.....	10
<b>Figura 5:</b> Formação da agarobiose (aldeído hidratado) através de hidrólise ácida parcial (HCl 0,1 M; 20 min; 95°C).....	11
<b>Figura 6:</b> Formação de oligossacarídeos redutores derivados de <i>kappa</i> -carragenana através de hidrólise ácida parcial (HCl 0,1 M; 3 h; 60 °C).....	11
<b>Figura 7:</b> Mecanismo de geração de fluxo eletroosmótico.....	13
<b>Figura 8:</b> Comparação entre os perfis dos fluxos pressurizado (CLAE) e eletroosmótico (EC) .....	14
<b>Figura 9:</b> Representação de espécies neutras e carregadas (cargas positivas e negativas) migrando em direção ao cátodo, independentemente de suas cargas, sendo carregadas pelo fluxo eletroosmótico.....	15
<b>Figura 10:</b> Ilustração exemplificando duas metodologias para inserção de grupos cromóforos e fluoróforos via terminal redutor.....	17
<b>Figura 11:</b> Ilustração do processo de detecção indireta por UV. ....	18

<b>Figura 12:</b> Síntese de um oligossacarídeo utilizando glicosil tricloroacetamidas e derivados 1,6-anidrogucose .....	20
<b>Figura 13:</b> Síntese enzimática de um glicosídeo envolvido na rejeição em transplantes.....	21
<b>Figura 14:</b> Exemplo de obtenção de glicosídeos a partir de oligossacarídeos através de aaminação redutiva.. .....	22
<b>Figura 15:</b> Síntese química da unidade repetitiva do polissacarídeo imunodominante de <i>Streptococcus pneumoniae</i> tipo 27 .....	23
<b>Figura 16:</b> Método de obtenção de alquilglicosídeos sulfatados.....	24
<b>Figura 17:</b> Reação de óxido de dibutilestanho com diol seguida de reação regioseletiva frente a um eletrófilo.....	25
<b>Figura 18:</b> Mecanismo proposto para a participação do CsF em reações de acetais de dibutilestanileno .....	27
<b>Figura 19:</b> Monossustituição em O-3 do metil $\beta$ -lactosídeo.....	28
<b>Figura 20:</b> Estrutura dimérica do acetal de dibutilestanileno do benzil 2,6-di-O-benzil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo.....	28
<b>Figura 21:</b> Estruturas diméricas possíveis de acetais de dibutilestanileno de 3-O-benzil-1,2-O-isopropilideno-D-glucofuranose; a partir da esquerda: espécie 5,5-dimérica, 6,6-dimérica e 5,6-dimérica.....	29
<b>Figura 22:</b> Estrutura da ascarbose, oligossacarídeo hipoglicemiante inibidor de glucosidases intestinais .....	31
<b>Figura 23:</b> Oligossacarídeos hipoglicemiantes: (A) dissacarídeo MDL 73945 e (B) glucopiranosilmoranolinas.....	32

<b>Figura 24:</b> Oligossacarídeo SR90107A: seqüência mínima ligante da antitrombina III.....	33
<b>Figura 25:</b> Estrutura química do oligossacarídeo PI-88 (fosfomanopentose sulfato).....	33
<b>Figura 26:</b> Oligossacarídeos quimicamente sulfatados constituídos por $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4) com potencial atividade antigênica (KÄSBAUER <i>et al.</i> , 2001).....	34
<b>Figura 27:</b> Estruturas mínimas ligantes no heparan sulfato e em agaranas sulfato.....	38
<b>Figura 28:</b> Representação dos alquiloligossacarídeos quimicamente sulfatados com alta atividade anti-HIV-1.....	40
<b>Figura 29:</b> Reação de ciclização em carragenanas.....	61
<b>Figura 30:</b> Estruturas da <i>kappa</i> - e <i>theta</i> -carragenanas, agarose 6-sulfato e agarana piruvatada e sulfatada.....	61
<b>Figura 31:</b> Hidrólise redutiva parcial em carragenanas.....	62
<b>Figura 32:</b> Perfil de eluição da cromatografia de troca aniônica em DEAE Sephadex A-25 (Cl <sup>-</sup> ). Hidrolisado da agarana de <i>Acanthophora spicifera</i> .....	63
<b>Figura 33:</b> Espectros de ESIMS do agarobiitol; 4 <sup>2</sup> ,6 <sup>2</sup> -piruvil agarobiitol; agarobiitol 2 <sup>2</sup> -sulfato; 4 <sup>2</sup> ,6 <sup>2</sup> -piruvil agarobiitol 2 <sup>2</sup> -sulfato .....	66
<b>Figura 34:</b> Espectro de ESIMS do agarotetraitol 2 <sup>2</sup> ,2 <sup>4</sup> -dissulfato.....	67
<b>Figura 35:</b> Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25 (Cl <sup>-</sup> ) do produto de HRP de <i>kappa</i> -carragenana.....	68

<b>Figura 36:</b> Espectros de ESIMS em modo negativo e RMN de $^{13}\text{C}$ do carrabiitol 4 <sup>2</sup> -sulfato (KA). .....	69
<b>Figura 37:</b> Espectro de ESIMS em modo negativo e espectro de HMQC do carratetraitol 4 <sup>2</sup> ,4 <sup>4</sup> -dissulfato (KB).....	70
<b>Figura 38:</b> Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25 (Cl <sup>-</sup> ) do produto de HRP de <i>theta</i> -carragenana.....	72
<b>Figura 39:</b> Espectros de ESIMS em modo negativo e RMN de $^{13}\text{C}$ do carrabiitol 2 <sup>1</sup> -sulfato (TA).....	73
<b>Figura 40:</b> Espectro de ESIMS em modo negativo e espectro de HSQC do carratetraitol 2 <sup>1</sup> ,2 <sup>3</sup> -dissulfato (KB).....	74
<b>Figura 41:</b> Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25 (Cl <sup>-</sup> ) do produto de HRP da agarose 6-sulfato.....	76
<b>Figura 42:</b> Espectros de ESIMS em modo negativo e RMN de $^{13}\text{C}$ do agarobiitol 6 <sup>2</sup> -sulfato (GA).....	77
<b>Figura 43:</b> Cromatografia de camada delgada referente a 4 h de HRP da agarose comercial.....	80
<b>Figura 44:</b> Cromatografia de camada delgada das frações cromatográficas obtidas a partir da cromatografia em coluna de sílica.....	81
<b>Figura 45:</b> Espectros de ESIMS em modo positivo e RMN de $^{13}\text{C}$ do agarotetraitol.....	82
<b>Figura 46:</b> Perfil de eluição da cromatografia de filtração em gel (BioGel P-2) do produto de hidrólise ácida parcial com HCl concentrado em agarose neutra comercial Galp-(1→3)-β-D-Galp-(1→4)-α-3,6-An-L-Galp-(1→3)-D-Galp.....	83

**Figura 47:** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C e estrutura química do pentassacarídeo neutro:  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3,6-An-L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3,6-An-L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Galp.....83

**Figura 48:** Exemplos de oligossacarídeos alditóis isômeros: carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato e carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato (isômeros de posição); agarobiitol e carrabiitol (diastereoisômeros).....86

**Figura 49:** Fragmentação diferencial entre os isômeros carratetraitol-4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato e carratetraitol-2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato com ESIMS/MS em modo negativo do íon *m/z* 813.....87

**Figura 50:** Fragmentação dos isômeros agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato(A), carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato (B), carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato (C) e agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (D) com ESIMS/MS em modo negativo do íon *m/z* 405.....89

**Figura 51:** Estrutura química do ácido *p*-toluenosulfínico (TSA).....91

**Figura 52:** Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato em diferentes temperatura e voltagens. Tampão: 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 10 mM de tetraborato, 10 mM de TSA, pH 10.....92

**Figura 53:** Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato variando-se a concentração de íons borato.....93

**Figura 54:** Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato em diferentes temperatura e voltagens. Tampão: 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 20 mM de tetraborato, 10 mM de TSA, pH 10. ....94

**Figura 55:** Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição carratetraitol-4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato (A) e carratetraitol-2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato(B) .....95

<b>Figura 56:</b> Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição agarobiitol 6 <sup>2</sup> -sulfato (A) e agarobiitol-2 <sup>2</sup> -sulfato (B). .....	96
<b>Figura 57:</b> Eletroferograma correspondente à análise do 4 <sup>2</sup> ,6 <sup>2</sup> -piruvil agarobiitol. ....	97
<b>Figura 58:</b> Eletroferogramas a mistura dos oligossacarídeos 4 <sup>2</sup> ,6 <sup>2</sup> -piruvil agarobiitol; carrabiitol 4 <sup>2</sup> -sulfato; carrabiitol-2 <sup>1</sup> -sulfato; agarobiitol 6 <sup>2</sup> -sulfato; agarobiitol-2 <sup>2</sup> -sulfato; carratetraitol-4 <sup>2</sup> ,4 <sup>4</sup> -dissulfato; carratetraitol-2 <sup>1</sup> ,2 <sup>3</sup> -dissulfato. ....	97
<b>Figura 59:</b> Correlação entre o aumento dos tempos de retenção dos dissacarídeos alditóis e viabilidade de suas hidroxilas <i>cis</i> vicinais e alditóis; as setas indicam as hidroxilas favoráveis a complexação com borato.....	101
<b>Figura 60:</b> Equilíbrio químico dos monocomplexos 1:1 (BL <sup>-</sup> ) tetrahidroxiborato-dissacarídeos alditóis mais prováveis.....	103
<b>Figura 61:</b> Esquema da curva de hidrólise redutiva parcial da kappa-carragenana através de EC.....	107
<b>Figura 62:</b> Eletroferogramas correspondetes a alguns tempos de hidrólise redutiva parcial de 3 diferentes polissacarídeos: (A) <i>kappa</i> -carragenana; (B) agarose 6-sulfata e (C) <i>theta</i> -carragenana.....	109
<b>Figura 63:</b> Formação do β-D-Galp pentaacetato (2) a partir da D-galactose (1).....	112
<b>Figura 64:</b> Formação do 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-bromo-α-D-Galp (3) a partir do β-D-Galp pentaacetato (2).....	113
<b>Figura 65:</b> Formação do Me 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-Galp (4) a partir do 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-bromo-α-D-Galp (3).....	114
<b>Figura 66:</b> Formação do Me β-D-Galp (5) a partir do Me 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-Galp (4).....	115

<b>Figura 67:</b> Formação dos compostos Me 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp ( <b>6</b> ); Me 6-O-tosil- $\beta$ -D-Galp e (7) Metil 6-O- <i>tert</i> -butildimetilsilil- $\beta$ -D-Galp ( <b>8</b> ) a partir do Me $\beta$ -D-Galp ( <b>5</b> ).....	118
<b>Figura 68:</b> Reação geral para a obtenção dos compostos apresentados na <b>Tabela 8</b> ...	121
<b>Figura 69:</b> Espectro de HSQC do composto <b>5b</b> .....	122
<b>Figura 70:</b> Espectro de HSQC do composto <b>5c</b> .....	123
<b>Figura 71:</b> Espectro de HMBC do composto <b>6b</b> .....	124
<b>Figura 72:</b> Sulfatação do 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp.....	125
<b>Figura 73:</b> Espectros de RMN de $^{119}\text{Sn}$ de soluções dos acetais de dibutilestanileno dos compostos <b>5</b> , <b>6</b> , e <b>5f</b> em $\text{CDCl}_3$ .....	127
<b>Figura 74:</b> Dímeros mistos possíveis a partir do composto <b>5</b> .....	130
<b>Figura 75:</b> Espectros de RMN de $^{119}\text{Sn}$ de soluções dos acetais de dibutilestanileno em $\text{DMF}_{d7}$ .....	133
<b>Figura 76:</b> Mecanismo de reação para a alquilação de um galactosídeo livre: (A) anteriormente estabelecido; (B) proposto neste trabalho.....	135
<b>Figura 77:</b> Espectro de HSQC do composto <b>10</b> . <b>G</b> e <b>A</b> correspondem a unidades Galp and 3,6-AnGalOH, respectivamente.....	137
<b>Figura 78:</b> Rota semi-sintética dos compostos <b>10</b> à <b>22</b> .....	139
<b>Figura 79:</b> Alquilglicosídeos sulfatados submetidos aos ensaios para a verificação da atividade anti-HSV.....	141



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação das carragenanas de acordo com estruturas ideais das unidades A e B....	3
<b>Tabela 2:</b> Assinalamentos de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ dos dissacarídeos alditóis ( <b>A</b> ) agarobiitol; ( <b>B</b> ) 4 <sup>2</sup> ,6 <sup>2</sup> -piruvil agarobiitol; ( <b>C</b> ) agarobiitol 2 <sup>2</sup> -sulfato; ( <b>D</b> ) 4 <sup>2</sup> ,6 <sup>2</sup> -piruvil agarobiitol 2 <sup>2</sup> -sulfato.....	64
<b>Tabela 3 :</b> Íons moleculares observados nos espectros observados da <b>Figura 33</b> .....	66
<b>Tabela 4:</b> Rendimentos, assinalamentos de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ , e íons identificados na análise de ESIMS dos oligossacarídeos derivados da <i>kappa</i> -carragenana carrabiitol 4 <sup>2</sup> -sulfato (KA) e carratetraitol 4 <sup>2</sup> ,4 <sup>4</sup> -dissulfato (KB).....	71
<b>Tabela 5:</b> Rendimentos, assinalamentos de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ , e íons identificados na análise de ESIMS dos oligossacarídeos derivados da <i>theta</i> -carragenana carrabiitol 2 <sup>1</sup> -sulfato (TA) e carratetraitol 2 <sup>1</sup> ,2 <sup>3</sup> -dissulfato (TB).....	75
<b>Tabela 6:</b> Rendimento, assinalamentos de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ , e íons identificados na análise de ESIMS do oligossacarídeo derivado da agarose 6-sulfato, agarobiitol 6 <sup>2</sup> -sulfato (GA).....	78
<b>Tabela 7:</b> Tempos de retenção e resolução entre picos <sup>a</sup> dos oligossacarídeos 4 <sup>2</sup> ,6 <sup>2</sup> -piruvil agarobiitol (WB); carrabiitol 4 <sup>2</sup> -sulfato (KA); carrabiitol-2 <sup>1</sup> -sulfato (TA); agarobiitol 6 <sup>2</sup> -sulfato (GA); agarobiitol-2 <sup>2</sup> -sulfato (WA); carratetraitol-4 <sup>2</sup> ,4 <sup>4</sup> -dissulfato (KB); carratetraitol-2 <sup>1</sup> ,2 <sup>3</sup> -dissulfato (TB) .....	98
<b>Tabela 8:</b> Di- e monoalquilações dos metil $\beta$ -galactosídeos <i>via</i> acetais de dibutilestanileno.....	120
<b>Tabela 9:</b> Concentração inibitória 50% (CI <sub>50</sub> ) apresentada pelos compostos <b>12</b> , <b>13</b> e <b>22</b> , e pelo mistura de isômeros dissulfatados/monossulfatados .....	142

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**EM**: espectrometria de massa. Esta técnica também é descrita com a abreviatura **MS** (*mass spectrometry*); como no caso de **ESIMS** (*electrospray mass spectrometry*) e **ESIMS/MS**.

**DIC**: dissociação induzida por colisão ou **CID** (*collision induced dissociation*)

**EC**: eletroforese capilar

**FEO**: fluxo eletroendosmótico

**RMN-<sup>13</sup>C**: ressonância magnética nuclear de carbono-13

**RMN-<sup>1</sup>H**: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

**RMN-<sup>119</sup>Sn**: ressonância magnética nuclear de estanho-119

**DEPT**: *distortionless enhancement by polarization transfer*

**COSY**: *correlation spectroscopy*

**TOCSY**: *total correlation spectroscopy*

**HMQC**: *heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*

**HSQC**: *heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*

**HMBC**: *heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy*

**T<sub>2</sub>**: tempo de relaxação transversal

**J**: constante de acoplamento

**MHz**: megahertz

**D<sub>2</sub>O**: óxido de deutério

**CD<sub>3</sub>OD**: metanol deuterado

**CDCl<sub>3</sub>**: clorofórmio deuterado

**DMF-*d*<sub>7</sub>**: dimetilformamida deuterada

**THF**: tetraidrofurano

**4-MMB**: 4-metilmorfolina borano

**Bu<sub>2</sub>SnO**: óxido de dibutilestanho

**CsF**: fluoreto de cézio

**TBAF**: fluoreto de tetrabutilamônio

**TBAB**: brometo de tetrabutilamônio

**Me<sub>3</sub>N.SO<sub>3</sub>**: complexo trióxido de enxofre/trimetilamônia

## RESUMO

Hidrólise redutiva parcial foi utilizada para produzir oligossacarídeos alditóis a partir de galactanas sulfatadas, com estruturas repetitivas, obtidas de quatro diferentes espécies de Rhodophyta: *kappa*-carragenana (*Kappaphycus alvarezii*), *theta*-carragenana (*Gigartina skottsbergii* – *lambda*-carragenana pós-tratamento alcalino), agarose 6-sulfato (*Gracilaria domingensis*), e agarana 2-sulfato piruvilada (*Acanthophora spicifera* – agarana sulfatada piruvilada pós-tratamento alcalino). Cada hidrolisado foi submetido à cromatografia de troca aniônica e filtração em gel. Os oligossacarídeos alditóis isolados foram caracterizados por espectroscopia de RMN em 1D e 2D e por espectrometria de ESIMS. Oligossacarídeos neutros também foram preparados a partir de agarose comercial sendo as purificações dos mesmos realizadas por uso de solventes orgânicos e cromatografia em coluna de sílica. Alguns dos oligossacarídeos alditóis apresentaram-se como isômeros de posição de grupo sulfato, sendo demonstrado que alguns deles apresentavam fragmentação diferencial pelo uso da dissociação induzida por colisão (DIC) nas análises de ESIMS/MS. Estes isômeros também foram separados por eletroforese capilar (EC) em tampão contendo íons borato. A correlação entre a disponibilidade das hidroxilas passíveis à complexação com o borato, e a migração relativa dos oligossacarídeos foi demonstrada. EC também foi utilizada para acompanhar o processo de hidrólise redutiva parcial, através da análise dos produtos obtidos em diferentes tempos de hidrólise, para diferentes modelos de galactanas sulfatadas. Assim, foi demonstrado que o posicionamento dos grupos sulfato presentes nestas galactanas influencia a velocidade de hidrólise redutiva parcial. Metilgalactosídeos sintéticos foram utilizados como modelos para o desenvolvimento de condições de alquilação regioseletiva para a introdução de longas cadeias alquila nos oligossacarídeos através do uso de intermediários organo-estanho. Os intermediários destas reações foram estudados por espectroscopia de RMN de  $^{119}\text{Sn}$ , sendo demonstrado que algumas deduções tidas como verdadeiras sobre as estruturas destes compostos em solução eram incorretas. Além disso, um novo mecanismo de reação para este tipo de intermediário está sendo proposto. As condições de alquilação foram então aplicadas para a síntese de éteres com longas cadeias alquila a partir de alguns dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial, sendo também demonstrado que grupos sulfato podem ser introduzidos regioseletivamente. Os glicosídeos semi-sintéticos sulfatados e alquilados foram avaliados quanto à atividade anti-herpética utilizando três cepas do vírus HSV. Neste estudo, o composto  $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-D-GalOH mostrou-se ativo para todas as cepas virais, enquanto o seu isômero,  $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH mostrou-se inerte para todas as cepas. Estes resultados indicam que fatores, tais como, presença de porções hidrofóbicas e posicionamento de grupos sulfato, são cruciais na atividade antiviral de carboidratos sulfatados.

## ABSTRACT

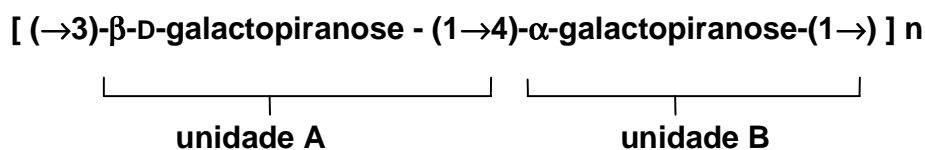
Partial reductive hydrolysis was used to produce oligosaccharide alditols from sulfated galactans with repeating diads obtained from four different Rhodophyta species: *kappa*-carrageenan (*Kappaphycus alvarezii*), *theta*-carrageenan (*Gigartina skottsbergii* – alkali-treated lambda-carrageenan), agarose 6-sulfate (*Gracilaria domingensis*), and pyruvylated agaran 2-sulfate (*Acanthophora spicifera* – alkali-treated pyruvylated agaran sulfate). Each hydrolyzate was submitted to anion-exchange and gel-filtration chromatography and the isolated oligosaccharide alditols were characterized by 1D, 2D NMR spectroscopy and ESIMS spectrometry. Neutral oligosaccharides were also prepared from commercial agarose, treatment with organic solvents and chromatography on silica gel column being utilized for their purification. Some of the resulting oligosaccharide alditols were positional isomers of sulfate substituents and it was demonstrated that some of them had different fragmentation patterns by use of collision induced dissociation (CID) on ESIMS/MS analysis. These isomers were also completely separated by capillary electrophoresis in a borate buffer. A correlation between the hydroxyl groups availability for borate complexation, and the oligosaccharides relative migration were shown. The capillary electrophoresis method was then used to follow partial reductive hydrolysis process to analyze different sulfated galactan models. It was found that the galactan sulfation patterns influence the reductive partial hydrolysis rate. For chemical modifications of oligosaccharides, methyl galactoside derivatives were used to define conditions for regioselective alkylations by means of organotin chemistry. The acetal intermediates in these reactions were studied by  $^{119}\text{Sn}$  spectroscopy and it was demonstrated that some long held assumptions about their structures in solution were incorrect. In addition, a novel reaction mechanism for this kind of intermediate has been proposed. The alkylation conditions were then applied to synthesize long chain ethers from some of the oligosaccharides and it was also shown that sulfate groups could be regioselectively added. The semi-synthetic alkylated/sulfated glycosides of oligosaccharide alditols were tested against three strains of HSV. In this study,  $\beta$ -D-Galp 4-sulfate-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecyl-D-GalOH was active against all virus strains while its isomer,  $\beta$ -D-Galp 3-O-sulfate-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecyl-L-GalOH was not. These results indicate that factors, such as hydrophobic portions and sulfation positioning, are crucial for antiviral activity of sulfated sugars.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. GALACTANAS DE ALGAS MARINHAS

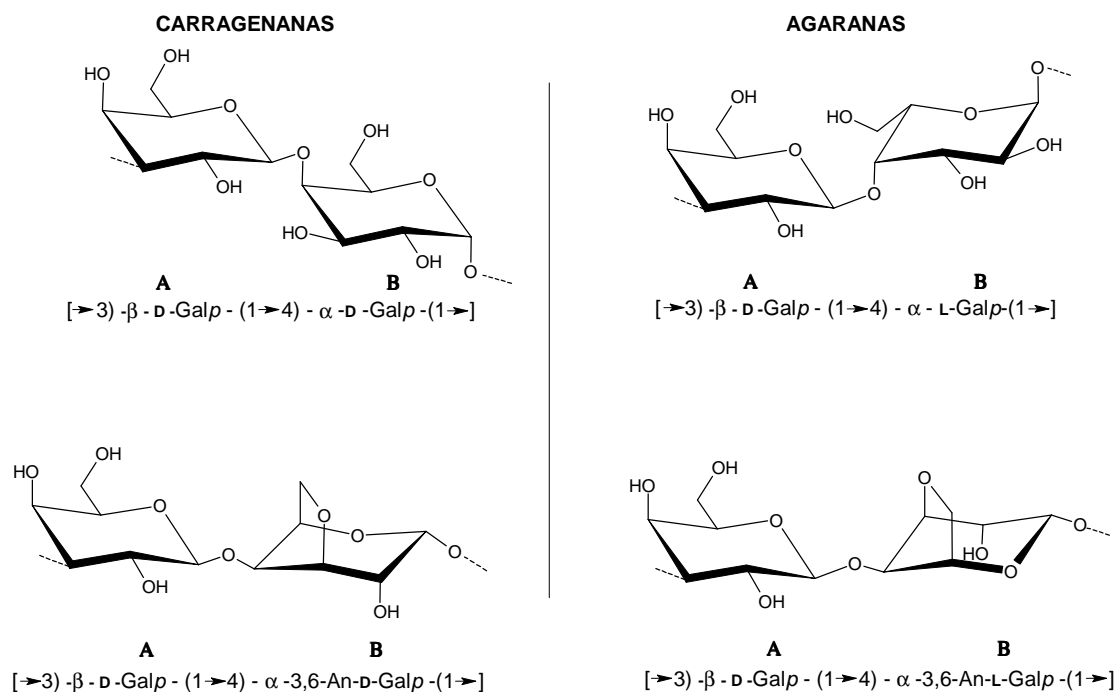
Os polissacarídeos de algas possuem características que os diferenciam dos polissacarídeos isolados de outros vegetais, como por exemplo, presença de unidades de 3,6-anidrogactose e de grupos sulfato (USOV, 1998). A parede celular das algas é composta por dois componentes principais: componente fibrilar (formador do esqueleto da parede) e componente amorfo, o qual forma uma matriz na qual o componente fibrilar se encontra embebido. O componente amorfo geralmente possui uma composição variada compreendendo até 70% do peso seco da parede celular, sendo encontrado em maior quantidade em Phaeophyta e Rhodophyta, onde correspondem aos polissacarídeos comercialmente explorados: ácido alginico, agaranas e carragenanas (LEE, 1989).

Em Rhodophyta, o componente amorfo da parede celular é formado por galactanas que apresentam uma estrutura linear formada por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligadas glicosidicamente através das posições 1 e 3 (unidade **A**) e  $\alpha$ -galactopiranosose ligadas através das posições 1 e 4 (unidade **B**). Assim, as galactanas formam um arranjo alternado entre as unidades **A** e **B**, ou seja,  $(AB)_n$  (PAINTER, 1983):



A estereoquímica da unidade **B** apresenta grande importância na classificação das galactanas de algas vermelhas. Se a unidade **B** pertencer à série D-, esta galactana classifica-se como carragenana. Se a unidade **B** pertencer à série L-, esta galactana classifica-se como agarana (PAINTER, 1983). Em muitos casos a unidade **B** de carragenanas e agaranas apresenta-se na forma de unidades de 3,6-anidrogactopiranosose (**Figura 1**).

**FIGURA 1:** Estrutura básica repetitiva de carragenanas e agaranas.



O alto grau de sulfatação e baixa ocorrência de grupos O-metil e acetal de ácido pirúvico são características marcantes das carragenanas (PAINTER, 1983). Ainda, pode-se classificar as carragenanas de acordo com a posição dos grupos O-sulfato nas unidades **A** e **B**, considerando-se estruturas ideais (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Classificação das carragenanas de acordo com estruturas ideais das unidades A e B (GREEN & YAPHE, 1984).

Família	Unidade A	Unidade B
	3-O- $\beta$ -D-galactose	4-O- $\alpha$ -D-galactose
Kappa		
$\kappa$	4-sulfato	3,6-AnGal
$\iota$	4-sulfato	3,6-AnGal 2-sulfato
$\mu$	4-sulfato	6-sulfato
$\nu$	4-sulfato	2,6-dissulfato
Lambda		
$\lambda$	2-sulfato	2,6-dissulfato
$\xi$	2-sulfato	2-sulfato
$\pi$	2-sulfato;4,6-O-(1-carboxietilideno)	2-sulfato
$\theta$	2-sulfato	3,6-AnGal 2-sulfato
Beta		
$\beta$	-	3,6-AnGal
$\alpha$	-	3,6-AnGal 2-sulfato
$\gamma$	-	6-sulfato
$\delta$	-	2,6-dissulfato
Omega		
$\omega$	6-sulfato	3,6-AnGal
$\varphi$	6-sulfato	6-sulfato

Já as galactanas do tipo agarana apresentam mais comumente grupos O-metil, principalmente em carbono-6 da unidade **A** e carbono-2 da unidade **B**, e normalmente são sulfatadas em menor grau quando comparadas às carragenanas.

DUCKWORTH e YAPHE (1971), consideraram que as agaranas compreendem 3 tipos de estruturas distintas:

- Agarose neutra: possui estrutura linear e regular constituída por unidades alternadas de (1→3)- $\beta$ -D-Galp e (1→4)-3,6-An- $\alpha$ -L-Galp (ARAKI & HIRASE, 1960);

- Agarose piruvatada: apresenta baixo grau de sulfatação, e ainda possui unidades de  $\beta$ -D-Galp substituídas por grupos 4,6-O-(1'-carboxietilideno);

- Agarose sulfatada: apresenta aumento no grau de sulfatação da unidade **B** ( $\alpha$ -L-Galp-6-sulfato), baixo teor de 3,6-AnGal e 4,6-O-(1'-carboxietilideno)-D-Galp.

Considerando as estruturas de agaranas descritas após o trabalho de DUCKWORTH e YAPHE (1971), constata-se que a classificação proposta por estes autores é no mínimo incompleta, já que não contempla a diversidade estrutural deste grupo de galactanas.

Embora a ocorrência e/ou localização de grupos O-sulfato, O-metil e acetal de ácido pirúvico seja uma das maneiras utilizadas para a classificação destes polissacarídeos, existem carragenanas e agaranas que apresentam padrão de substituição incomum. Grupos substituintes, tais como O-metil e acetal de ácido pirúvico (mais comuns em agaranas) têm sido observados em carragenanas (CHIOVITTI *et al.*, 1997). Mais recentemente foram encontradas agaranas com índice de sulfatação compatível com os apresentados por carragenanas altamente sulfatadas (DUARTE *et al.*, 2004).

Algumas destas galactanas apresentam complexos padrões de substituição por grupos O-metil, O-sulfato, acetal de ácido pirúvico e glicosil (USOV & ELASHVILI, 1991; CHIOVITTI *et al.*, 1997; DUARTE *et al.*, 2001) resultando em espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de alta complexidade bem como em grande número de produtos de metilação. Por esta razão, a obtenção de oligossacarídeos a partir destes polímeros é uma poderosa ferramenta para determinação do posicionamento dos substituintes, bem como no auxílio da



determinação de assinalamentos característicos no estudo pela ressonância magnética nuclear.

## 1.2. OLIGOSSACARÍDEOS

Por definição, oligossacarídeo é um composto que é constituído por um pequeno número de unidades monossacarídicas (de 2 até, aproximadamente, 10 resíduos) (STANEK *et al.*, 1965; PAOLETTI & JOHNSON, 1995). Esses compostos podem ser naturalmente encontrados em sistemas biológicos como produtos de seu metabolismo normal podendo exercer diversas funções. Em vegetais, podem servir principalmente como compostos de reserva ou como osmorreguladores, sendo a sacarose o oligossacarídeo de maior ocorrência em plantas (CROWE *et al.*, 1987).

KANDLER e HOPF (1980) classificaram os oligossacarídeos, de acordo com a sua origem, em oligossacarídeos primários e secundários. Oligossacarídeos primários são aqueles sintetizados *in vivo* a partir de um mono ou oligossacarídeo e um doador glicosil, pela ação de uma glicosiltransferase. Já oligossacarídeos secundários são aqueles originários de hidrólise, *in vivo* ou *in vitro*, a partir de oligossacarídeos maiores, polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos, podendo ser obtidos pela ação de hidrolases, bem como pela ação de ácidos.

Para polissacarídeos em geral, a obtenção de oligossacarídeos por métodos de hidrólise ácida ou enzimática, é importante na confirmação da seqüência das unidades monossacarídicas, configuração anomérica e tipos de ligação. Um exemplo que mostra a importância da hidrólise enzimática na determinação da estrutura de polissacarídeos é a capacidade de clivagem específica de ligações mais resistentes à hidrólise ácida. Isso é particularmente oportuno quando o polissacarídeo possui ligações mais sensíveis à hidrólise ácida, como por exemplo, ligações a unidades de L-arabinofuranose. Um exemplo similar é a ação da  $\beta$ -D-galactosidase sobre a agarose com liberação de neoagarobiose, neoagarotetraose, e outros oligossacarídeos contendo unidades

de 3,6-anidro-L-galactopirranose, que é extremamente lábil à presença de ácidos. A hidrólise ácida parcial, que tem por objetivo obter fragmentos maiores e/ou menores do polissacarídeo, deve ser muito bem controlada. Para tal, utiliza-se inicialmente condições de uma hidrólise ácida convencional, diminuindo a temperatura ou limitando o tempo, ou diminuindo a concentração de ácido, segundo informações colhidas das curvas de hidrólise (PAINTER, 1983).

Complexas misturas de oligossacarídeos podem ser originadas após uma hidrólise parcial. Deste modo, várias técnicas cromatográficas preparativas podem ser utilizadas para o fracionamento destes açúcares. Para mistura de oligossacarídeos neutros, a separação pode ser feita por filtração em gel utilizando Sephadex (dextrana) ou Bio-Gel P-2 (gel de poliacrilamida), por cromatografia de partição em celulose ou por cromatografia de adsorção em carvão-Celite. Para oligossacarídeos ácidos pode-se usar cromatografia de troca iônica; neste caso dietilaminoetilcelulose e dietilaminoetil-Sephadex são materiais apropriados e de alta capacidade de troca (PAINTER, 1983). Atualmente novos materiais para cromatografia têm sido empregados para purificação de oligossacarídeos: Superdex (*cross link* de agarose e dextrana), Superose (agarose), Sephacryl (alildextrana e metilenobisacrilamida) são algumas das matrizes mais utilizadas. Ainda, várias purificações de oligossacarídeos podem ser realizadas através de métodos eletroforéticos e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando variados tipos de materiais para preenchimento das colunas (USOV & ELASHVILI, 1991; VIVÉS *et al.*, 2001).

Oligossacarídeos piruvatados foram obtidos através de hidrólise parcial, a partir de polissacarídeos ácidos extracelulares produzidos pela bactéria gram negativa fitopatogênica de batata, *Erwinia crysanthemii*. A purificação destes oligossacarídeos foi realizada por filtração em gel (Bio-Gel P-2) e por cromatografia de troca iônica com detector de pulso amperométrico (YANG *et al.*, 2001).

Galacto-oligossacarídeos sulfatados foram preparados a partir de arabino-galacto-ramno-galacturonanas extraídas de sementes de *Lupinus polyphyllus* (Leguminosae), sendo feita hidrólise parcial e posterior sulfatação. Esses

oligossacarídeos foram analisados por cromatografia analítica de filtração em gel e o conteúdo de sulfato foi determinado por cromatografia iônica (KÄSBAUER *et al.*, 2001).

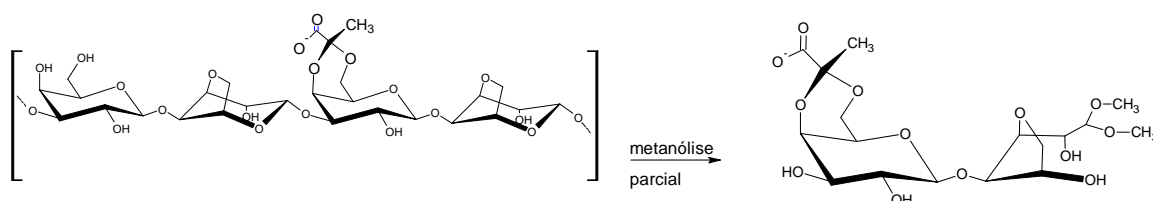
Técnicas de CLAE em coluna de troca iônica também foram usadas para a purificação de oligossacarídeos sulfatados obtidos a partir de heparan sulfato, sendo combinado o uso de eletroforese em gel de poliacrilamida (VIVÉS *et al.*, 2001).

### **1.2.1. Oligossacarídeos derivados de galactanas de algas vermelhas.**

Devido à presença de unidades de 3,6-anidrogactose (açúcar lábil em meio ácido), as hidrólises parciais utilizadas para a obtenção de oligossacarídeos a partir de carragenanas e agaranas apresentam algumas particularidades. Metanólise parcial (HIRASE, 1957; IZUMI, 1973; TAKANO *et al.*, 1998), hidrólise enzimática parcial (DUCKWORTH & YAPHE, 1971; YOUNG *et al.*, 1978; KNUTSEN *et al.*, 2001) e hidrólise redutiva parcial (USOV & ELASHVILI, 1991; USOV & ELASHVILI, 1995) são as técnicas utilizadas, e cada uma apresenta sua peculiaridade para a manutenção da integridade das unidades de 3,6-anidrogactose. Métodos de hidrólise ácida parcial convencional (HIRASE, 1957; IZUMI, 1973; YU *et al.*, 2002) também têm sido utilizados em galactanas de algas vermelhas, entretanto muitas vezes as unidades de 3,6-anidrogactose terminais são destruídas frente a estas condições mais drásticas.

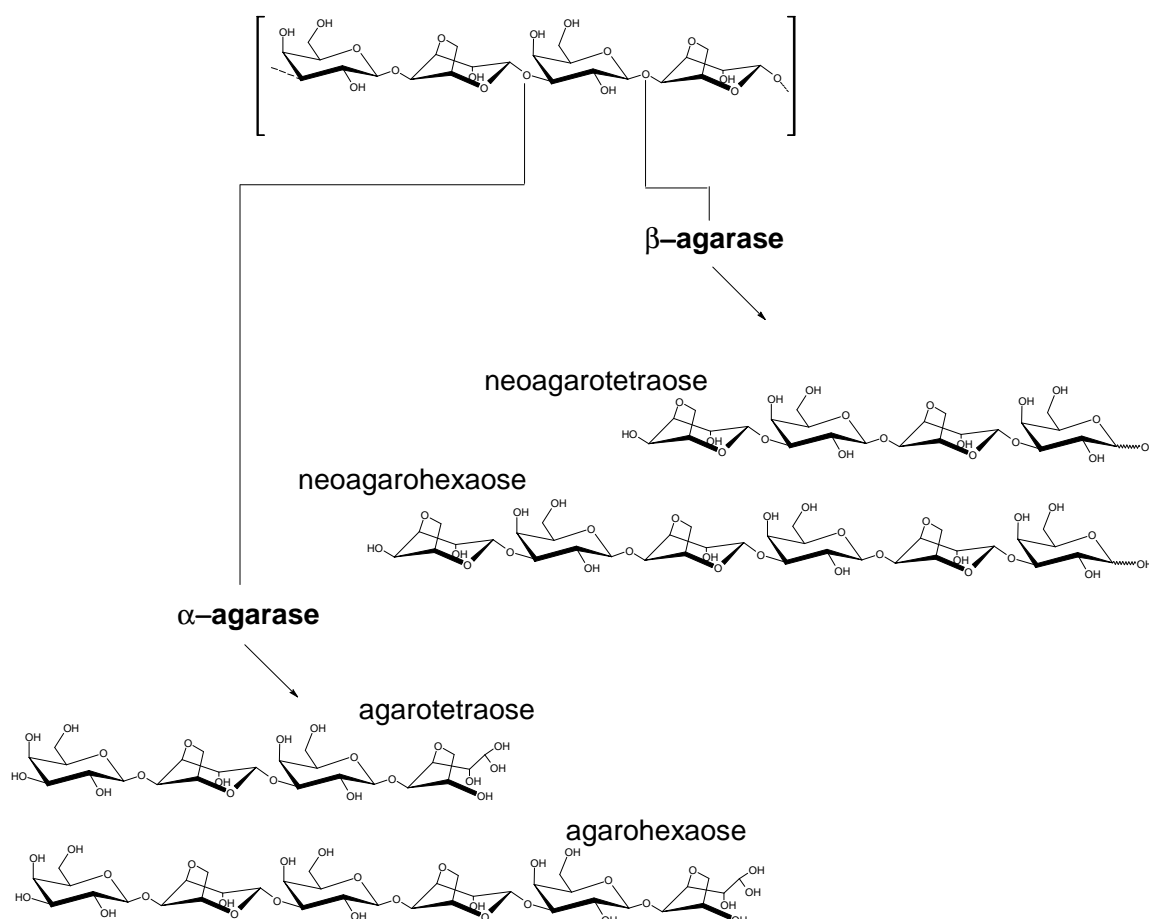
Com uso da metanólise parcial, as ligações 3,6-anidrogactosídicas são preferencialmente metanolisadas, formando oligossacarídeos contendo 3,6-anidrogactose dimetilacetal como unidades terminais (HIRASE, 1957; IZUMI, 1973; TAKANO *et al.*, 1998 - **Figura 2**).

**Figura 2:** Obtenção de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)-agarobiose dimetilacetil a partir de uma agarana com acetal de ácido pirúvico ligado, via metanólise parcial (IZUMI, 1973).



Nas hidrólises enzimáticas utiliza-se  $\beta$ -agarases e  $\beta$ -carragenases ( $\beta$ -galactosidases) que clivam especificamente as ligações  $\beta$ -galactosídicas gerando oligossacarídeos com terminais redutores de galactose. Os oligossacarídeos originados pela ação destas enzimas têm a nomenclatura usual baseada na sua origem e número de unidades monossacarídicas, utilizando-se o prefixo neo (neoagarobiose - neocarragenose, neoagarotetraose - neocarratetraose). Ainda, pode-se obter oligossacarídeos através de clivagem enzimática das ligação 3,6-anidrogaldactosídicas pela ação de uma  $\alpha$ -agarase, entretanto estes tipos de enzimas são de difícil obtenção. Os oligossacarídeos gerados pela quebra das ligação  $\alpha$ -3,6-anidrogaldactosídicas exibem seu terminal redutor na forma de um aldeído hidratado (DUCKWORTH & YAPHE, 1971; YOUNG *et al.*, 1978; KNUTSEN *et al.*, 2001 - **Figura 3**).

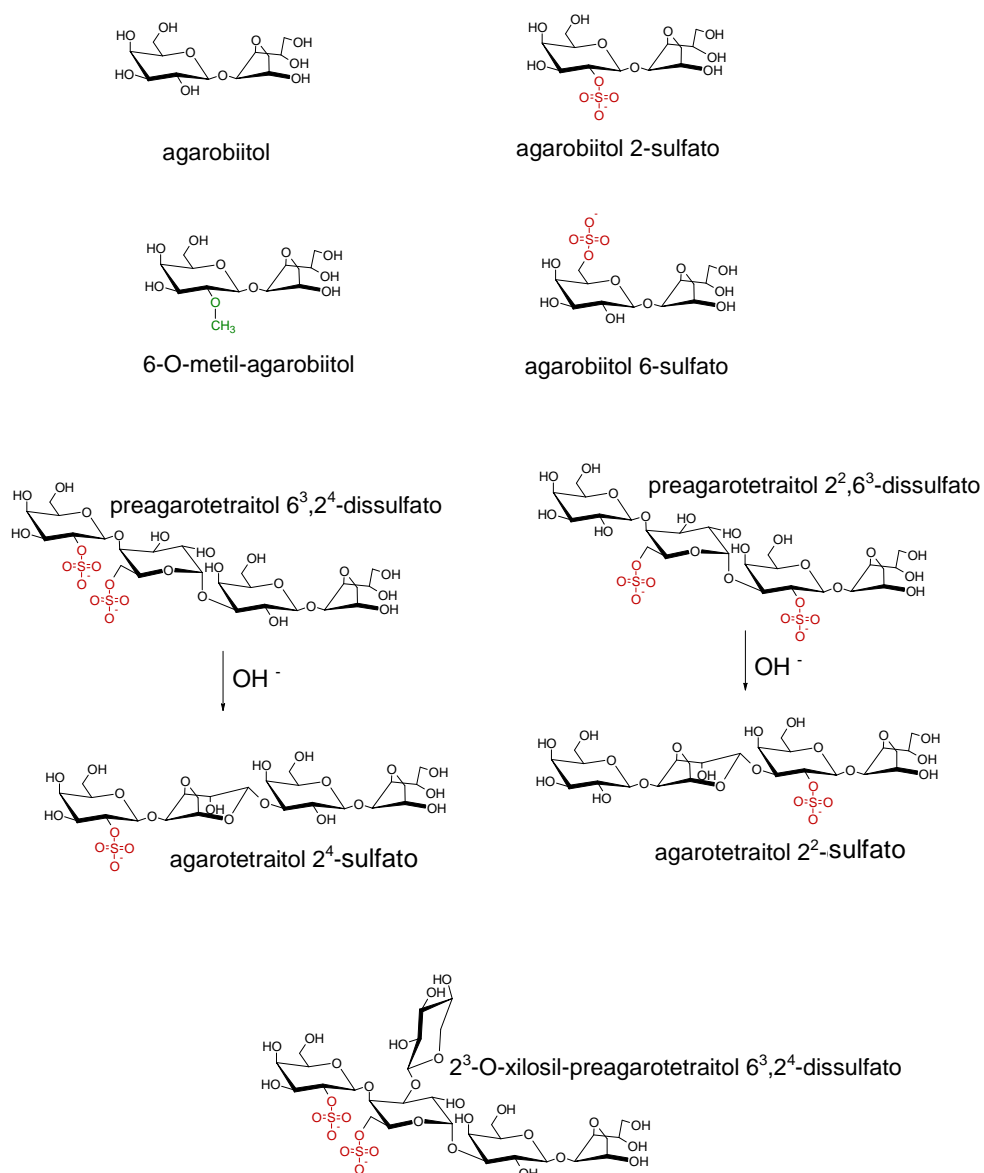
**Figura 3:** Formação de neoagarotetraose, neoagarohexaose (DUCKWORTH & YAPHE, 1971) e agarotetraose e agarohexaose (YOUNG *et al.*, 1978) produtos de uma  $\beta$ -agarase e  $\alpha$ -agarase respectivamente.



A hidrólise redutiva parcial consiste em uma hidrólise ácida branda na presença de complexo de 4-metilmorfolina borano (agente redutor estável em meio ácido). Como resultado, ocorre uma quebra seletiva da ligação 3,6-anidrogactosídicas, gerando uma série de oligossacarídeos com unidades de 3,6-anidrogactitol na sua extremidade, enquanto os grupos sulfatos são substancialmente retidos. Os oligossacarídeos alditóis produzidos neste tipo de hidrólises têm o nome usual baseado em sua origem, número de unidades e acrescentando-se o sufixo itol. Quando estes oligossacarídeos apresentam

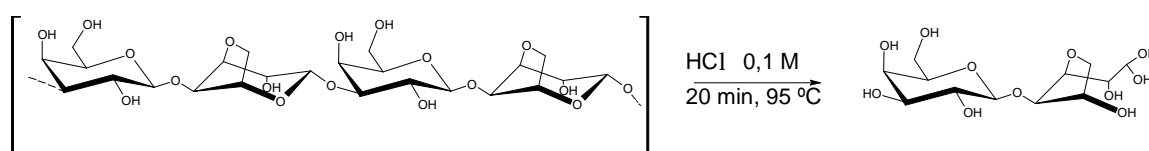
unidades precursoras de  $\alpha$ -3,6-AnGal ( $\alpha$ -galactopirranose 6-sulfato), utiliza-se o prefixo pre (USOV & ELASHVILI, 1991; USOV & ELASHVILI, 1997 - **Figura 4**).

**Figura 4:** Oligossacarídeos alditóis obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas. Estruturas publicadas até o ano de 2002 (USOV & ELASHVILI, 1991; USOV & ELASHVILI, 1997).



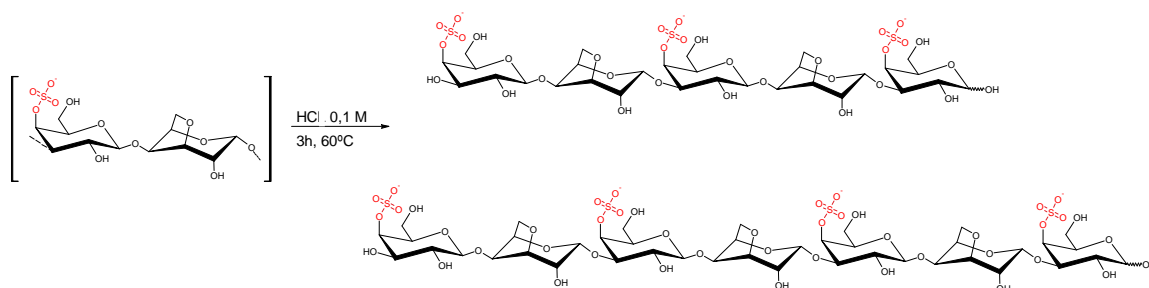
Com a utilização de uma hidrólise ácida parcial convencional, dois tipos de oligossacarídeos podem ser originados. Quando a hidrólise é suficientemente branda no que diz respeito à concentração de ácido, temperatura e tempo, formam-se oligossacarídeos similares aqueles obtidos pela ação de uma alfa-agarase (agarotetraose e agarohexaose,) e, principalmente, agarobiose na forma de aldeído hidratado (IZUMI, 1973 - **Figura 5**).

**Figura 5:** Formação da agarobiose (aldeído hidratado) através de hidrólise ácida parcial (HCl 0,1 M; 20 min; 95°C) segundo IZUMI (1973).



Quando as condições de hidrólise ácida parcial tornam-se mais drásticas ocorre degradação das unidades terminais de 3,6-AnGal. Desta forma, são gerados oligossacarídeos de número ímpar de unidades monossacarídicas, tendo tanto como terminal redutor e não redutor, unidades **A** (YU *et al.*, 2002 - **Figura 6**).

**Figura 6:** Formação de oligossacarídeos redutores derivados de *kappa*-carragenana através de hidrólise ácida parcial (HCl 0,1 M; 3 h; 60°C) segundo YU *et al.* (2002)



### 1.3. ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica capaz de promover rápida separação com alta resolução a partir de volumes de amostra extremamente pequenos. Embora os princípios da eletroforese capilar sejam conhecidos há muito tempo, a primeira aplicação relatada de separação em capilares de diâmetro micrométrico foi demonstrada em 1979 por MIKKERS *et al.* Essa técnica tem sido usada para a separação de moléculas de alto peso molecular, como polissacarídeos e proteínas, bem como para analitos de menor massa molecular, como aminoácidos, peptídeos, mono- e oligossacarídeos. O crescimento exponencial do número de publicações envolvendo esta técnica nos últimos dez anos relata a importância científica e a aplicabilidade comercial da EC (CARNEY & OSBORNE, 1991).

Geralmente o funcionamento de um equipamento de EC envolve a aplicação de alta voltagem, tipicamente 5 a 30 kV em um capilar de diâmetro reduzido gerando correntes na faixa de 10 a 100 mA. O uso do capilar apresenta várias vantagens, particularmente em relação ao efeito Joule. A alta resistência elétrica do capilar permite a aplicação de campos elétricos altos pois gera um aquecimento mínimo, além disso o formato de capilar propicia uma dissipação eficiente do calor gerado. O uso de campos elétricos altos resulta em tempo de análise curto, alta eficiência e resolução (ALTRIA, 1996; QUEIROZ & JARDIM, 2001).

Na eletroforese capilar, o capilar é preenchido com uma solução tampão e suas extremidades são mergulhadas em recipientes, que contém a solução tampão, e onde é aplicado um campo elétrico, que gera uma corrente no interior do capilar. Os eletrodos são feitos de um material inerte, tal como, platina, e são também mergulhados na solução para fechar o circuito. O capilar passa através de um detector, usualmente um detector espectrofotométrico de absorção no ultravioleta (UV) (ALTRIA, 1996; QUEIROZ & JARDIM, 2001).

Uma pequena quantidade de amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar. A aplicação do campo elétrico provoca o movimento dos

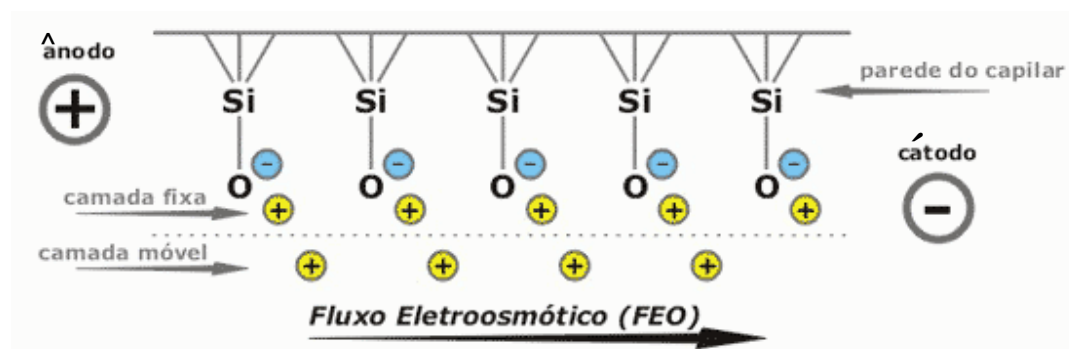


analitos em direção aos eletrodos. As separações em EC são baseadas na presença de um fluxo eletricamente induzido, denominado fluxo eletroosmótico (FEO), um fenômeno eletroforético que gera o fluxo da solução dentro do capilar, que faz com que os solutos se movimentem em direção ao detector. Este fluxo pode reduzir significativamente o tempo de análise ou forçar um íon a reverter a sua tendência de migração em direção a um eletrodo, pelo qual está sendo atraído, devido ao sinal de sua carga (ALTRIA, 1996; QUEIROZ & JARDIM, 2001).

### 1.3.1. Fluxo eletroosmótico

A parede do capilar de sílica contém grupos silanóis ( $\text{SiOH}$ ) os quais se ionizam ( $\text{SiO}^-$ ) quando em contato com soluções tampão com pH altos. Esta dissociação produz uma superfície carregada negativamente. Uma camada de contra-íon (cátions) é então formada próxima à parede do capilar a fim de manter a eletroneutralidade. Isto forma a dupla camada e cria uma diferença de potencial muito próxima à parede. Quando uma diferença de potencial (ddp) é aplicada, estes íons metálicos e suas moléculas associadas solvatadas com água migram em direção ao cátodo (ALTRIA, 1996; QUEIROZ & JARDIM 2001- **Figura 7**).

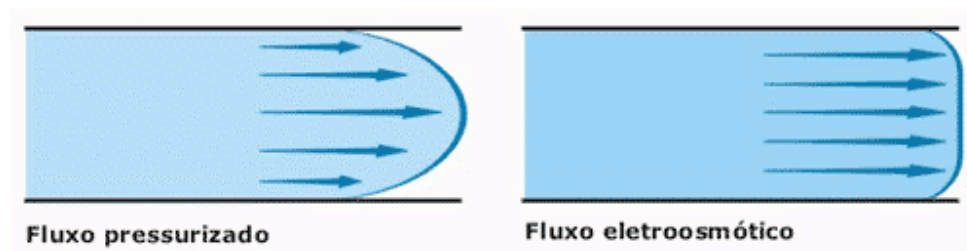
**Figura 7:** Mecanismo de geração de fluxo eletroosmótico (QUEIROZ & JARDIM, 2001).



O nível do FEO é altamente dependente do pH do eletrólito, uma vez que sua intensidade é governada pela ionização dos grupos silanóis (ácidos) da parede do capilar. Abaixo de pH 4, a ionização dos grupos silanóis é pequena e o FEO não é significativo, enquanto que acima de pH 9 os silanóis ficam completamente ionizados e portanto o FEO é alto (ALTRIA, 1996).

Se fizermos um corte no tubo capilar, como mostrado na **Figura 8**, verificamos que o perfil do FEO é do tipo plano (*plug*) e isto tem um efeito benéfico, uma vez que ele não contribui diretamente para o alargamento dos picos, pois as moléculas do soluto se moverão em velocidades muito próximas. Esta é uma grande vantagem da EC quando comparada ao perfil parabólico (fluxo laminar) da CLAE, característico do fluxo induzido por pressão. A solução em fluxo laminar move mais lentamente próximo a parede da coluna e mais rapidamente no centro, resultando em diferentes velocidades do soluto ao longo da coluna. Assim, quanto maior o tempo que o soluto despende para percorrer o leito da coluna mais largo se tornará o perfil do pico (QUEIROZ & JARDIM, 2001).

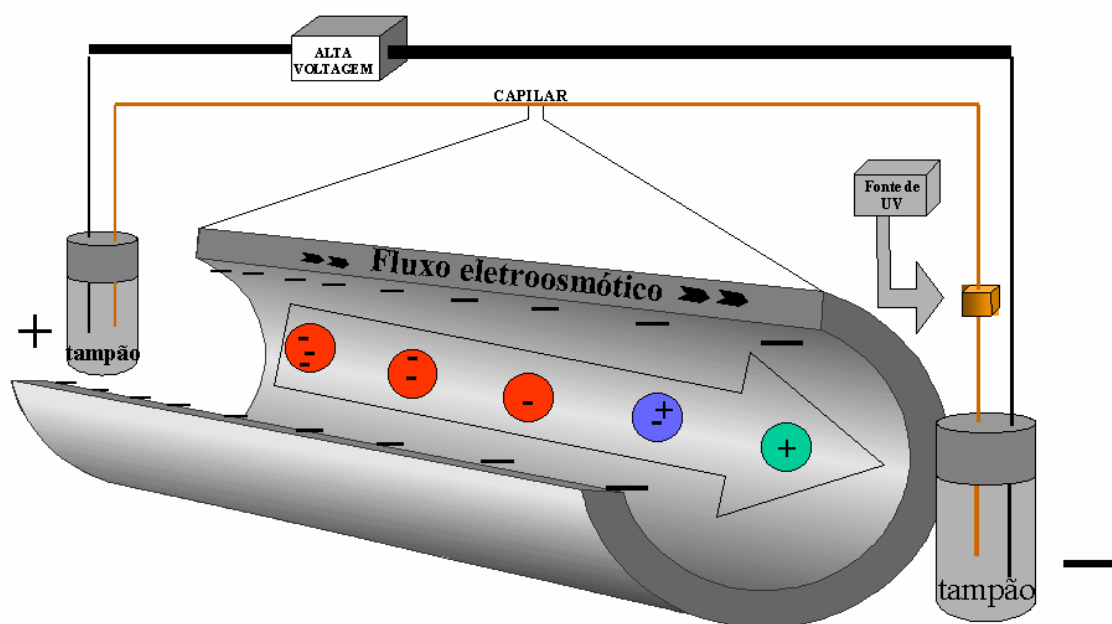
**Figura 8:** Comparação entre os perfis dos fluxos pressurizado (CLAE) e eletroosmótico (EC) (QUEIROZ & JARDIM, 2001).



Um outro benefício do FEO é que ele gera o movimento de quase todas as espécies, apesar das cargas, na mesma direção. Sob condições normais (superfície carregada negativamente), o fluxo é do ânodo para o cátodo. Ânions serão conduzidos em direção ao cátodo uma vez que o fluxo gerado pode ser mais que uma ordem de magnitude maior que as mobilidades eletroforéticas.

Assim, cátions, neutros e ânions serão eletroferografados em uma mesma corrida, uma vez que eles migram na mesma direção. A **Figura 9** mostra este processo. Cátions migram mais rápido, pois sofrem atração pelo cátodo, neutros são arrastados na mesma velocidade do FEO e não são separados e ânions migram mais lentamente uma vez que são atraídos para o ânodo, mas são arrastados pelo FEO em direção ao cátodo (CARNEY & OSBOURNE, 1991; QUEIROZ & JARDIM, 2001).

**Figura 9:** Representação de espécies neutras e carregadas (cargas positivas e negativas) migrando em direção ao cátodo, independentemente de suas cargas, sendo carregadas pelo fluxo eletroosmótico.



A análise pró-catódica, devido ao fluxo eletroosmótico, é chamada de técnica de polaridade normal. Alternativamente pode-se utilizar a técnica de polaridade reversa. Neste tipo de procedimento, utiliza-se tampões de baixo pH (aproximadamente 3), onde os grupos silanol do capilar estarão protonados e, deste modo, não haverá fluxo eletroosmótico. A partir daí, as polaridades dos

eletrodos deverão ser invertidas e conseqüentemente ocorrerá um processo eletroforético pró-anódico (CARNEY & OSBOURNE, 1991).

### **1.3.2. Eletroforese capilar: separação de oligossacarídeos.**

Uma vez que as principais formas para a obtenção de oligossacarídeos são a hidrólise parcial de macromoléculas e síntese orgânica, torna-se útil o desenvolvimento métodos analíticos apropriados para o monitoramento dos processos hidrolíticos e sintéticos utilizados para a obtenção destas moléculas. Por outro lado, estas técnicas analíticas também são extensivamente utilizadas para verificação da pureza dos oligossacarídeos obtidos.

Na síntese orgânica de açúcares e glicoconjugados, normalmente utiliza-se CCD (cromatografia em camada delgada) analítica para o acompanhamento dos passos sintéticos. Para o acompanhamento dos passos de purificação de oligossacarídeos obtidos por hidrólise, além da CCD, utilizam-se técnicas analíticas de cromatografia em papel, espectrometria de massa (EM), espectroscopia de RMN, métodos eletroforéticos convencionais em papel e gel de poliacrilamida e, mais recentemente CLAE. É importante destacar que RMN e EM são ferramentas indispensáveis para a elucidação estrutural de oligossacarídeos e outros carboidratos, superando, desta forma, a importância das outras técnicas citadas (EL RASSI, 1996).

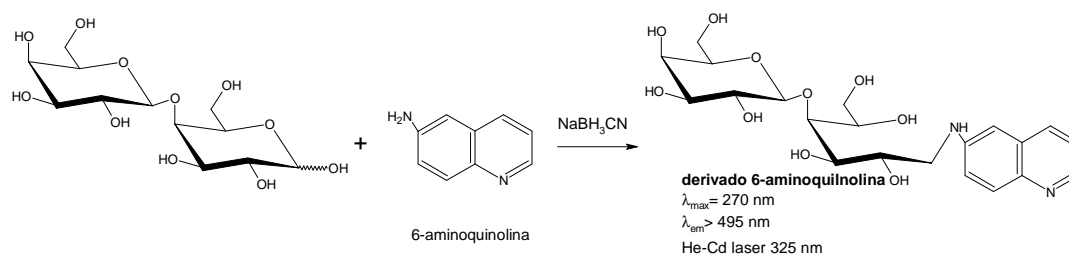
Devido à hidrofiliabilidade inerente a grande maioria dos oligossacarídeos, separações baseadas em métodos aquosos, incluindo CLAE, eletroforese em gel de poliacrilamida e eletroforese capilar (EC), tornam-se muito apropriadas. Neste aspecto, a EC apresenta várias vantagens sobre as demais técnicas citadas: oferece separações mais eficientes, tempos de análise mais curtos, menor consumo de amostra, menor consumo de reagentes e solventes (EL RASSI, 1996).

Para viabilizar a separação e detecção de oligossacarídeos por EC, pode-se explorar várias propriedades apresentadas pelos sacarídeos em geral. Mesmo carboidratos neutros são facilmente convertidos em espécies carregadas através

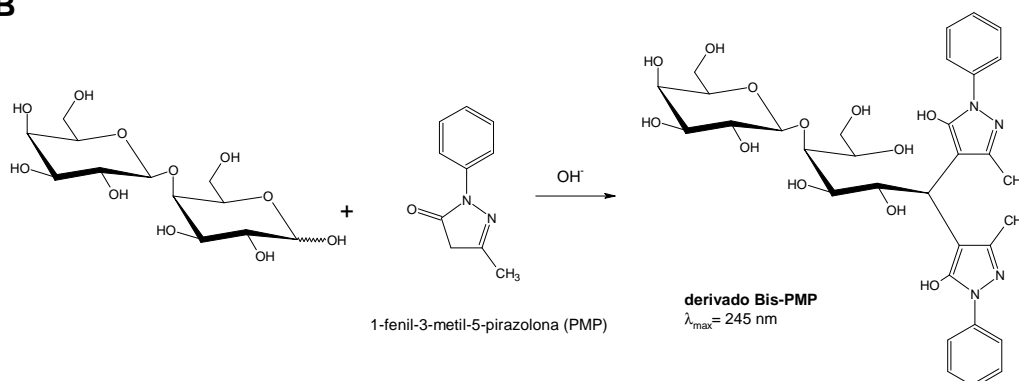
da formação de complexos com espécies carregadas, tais como, ânions borato e cátions metálicos, e desta forma, tornam-se passíveis de separação num campo elétrico (van DUIN *et al.*, 1985). Por outro lado, a reatividade apresentada pela extremidade redutora inerente à maioria dos açúcares, possibilita sua marcação com cromóforos (detecção por ultravioleta) ou fluoróforos (detecção por fluorescência), o que acarreta num aumento de sensibilidade dos métodos de detecção associados às técnicas de EC (EL RASSI, 1996 - **Figura 10**). Ainda, a oxidação eletroquímica dos carboidratos na superfície de eletrodos metálicos (detecção por pulso amperométrico), propicia um tipo de detecção altamente sensível para açúcares não derivatizados (CÓLON *et al.*, 1993)

**Figura 10:** Ilustração exemplificando duas metodologias para inserção de grupos cromóforos e fluoróforos via terminal redutor: **(A)** aminação redutiva; **(B)** reação de condensação (EL RASSI, 1996).

**A**



**B**

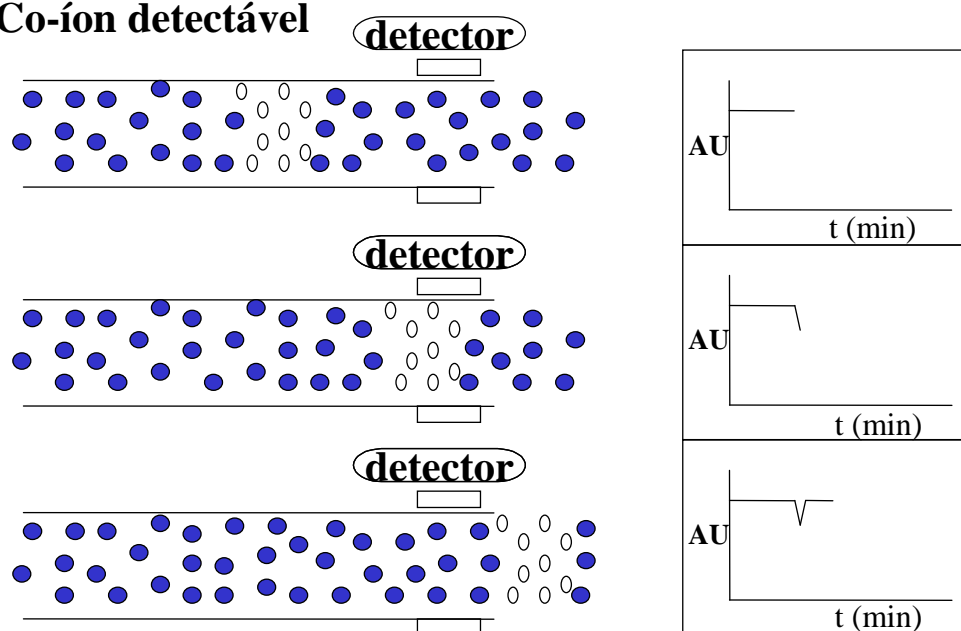


Alternativamente, pode-se utilizar esquemas de detecção indireta para carboidratos que, na grande maioria das vezes, não exibem absorção na região do ultravioleta (UV), e tampouco exibem emissão de fluorescência. A detecção indireta pode ser usada para compostos que não possuem propriedades físicas necessárias para um tipo de detecção específica. Na detecção indireta por UV, o tampão utilizado contém um co-íon detectável na região do UV, ou seja, um eletrólito com alta absorvidade molar. Deste modo, enquanto o tampão estiver passando pela janela de detecção, haverá uma alta absorção gerada pelo co-íon. Quando a banda de separação formada pelo analito, que não absorve no UV, chegar à janela de detecção, a absorção promovida pelo co-íon detectável é dispersa, cessando a absorção. Este evento de interrupção do *background* gerado pelo co-íon detectável, irá provocar a formação de picos negativos proporcionais a quantidade de analito não absorvente no eletroferograma resultante (EL RASSI, 1996 - **Figura 11**).

**Figura 11:** Ilustração do processo de detecção indireta por UV.

## 0 Analito

### • Co-íon detectável



De posse de um método apropriado para detecção do oligossacarídeo que se deseja analisar, pode-se separar praticamente qualquer mistura de oligossacarídeos por EC. O poder de resolução da técnica está ligado à voltagem, temperatura e comprimento do capilar utilizado na análise e, principalmente, a constituição do tampão.

Oligossacarídeos neutros (rafinose, sacarose, lactose, lactulose e celobiose) podem ser separados por uso de tampões de alto pH (100 mM de NaOH) sendo realizada detecção eletroquímica (CÓLON *et al.*, 1993).

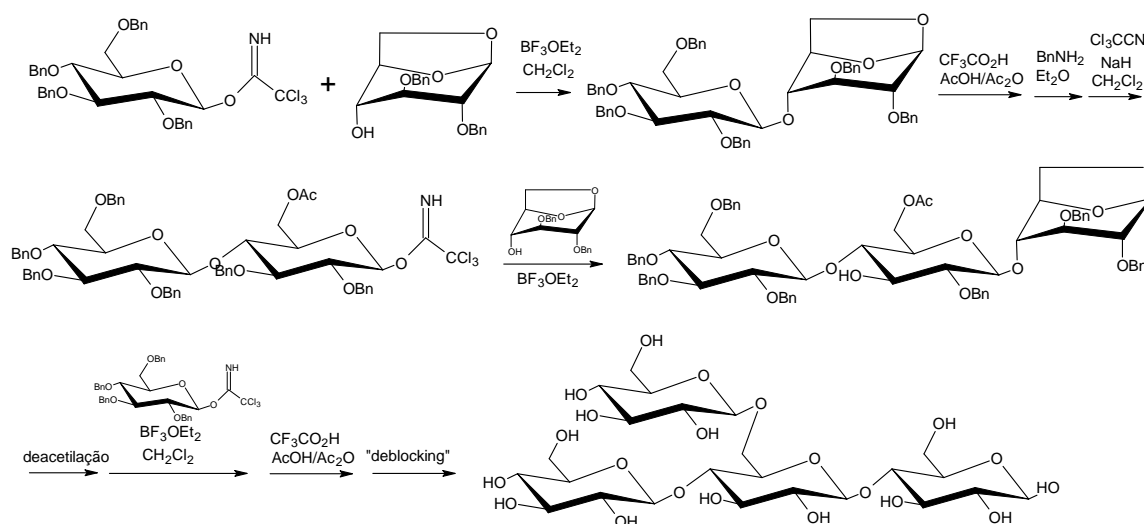
Oligossacarídeos ácidos derivados de pectinas (STROM & WILLIAMS, 2004) condroitin sulfato (CARNEY & OSBOURNE, 1991), ácido hialurônico (SUZUKI *et al.*, 2001, MACCARI *et al.*, 2004), heparan sulfato (LIU *et al.*, 2002) e carragenanas sulfatadas (YU *et al.*, 2002) vêm sendo extensivamente analisados por técnicas de EC. Estas moléculas muitas vezes apresentam-se como isômeros de posição de grupo sulfato numa mistura hidrolítica (CARNEY & OSBOURNE, 1991; SHEN *et al.*, 2001; DESCROIX *et al.*, 2003) e a EC mostra-se uma poderosa ferramenta capaz de separar estes isômeros.

#### 1.4. SÍNTESE DE GLICOSÍDEOS

Métodos sintéticos para obtenção de glicosídeos são particularmente úteis na obtenção de moléculas-modelo para a utilização em outras sínteses ou para testes de atividade biológica.

A síntese química normalmente envolve passos de proteção e desproteção das hidroxilas dos açúcares por grupamentos apropriados utilizados em química orgânica (SCHIMIDT & JUNG, 1999). O exemplo de síntese química de oligossacarídeos da **Figura 12**, mostra a importância das glicosil tricloroacetamidas como agentes glicosilantes e o uso de derivados 1,6-anidro como aceptor glicosil (COLLINS & FERRIER, 1995).

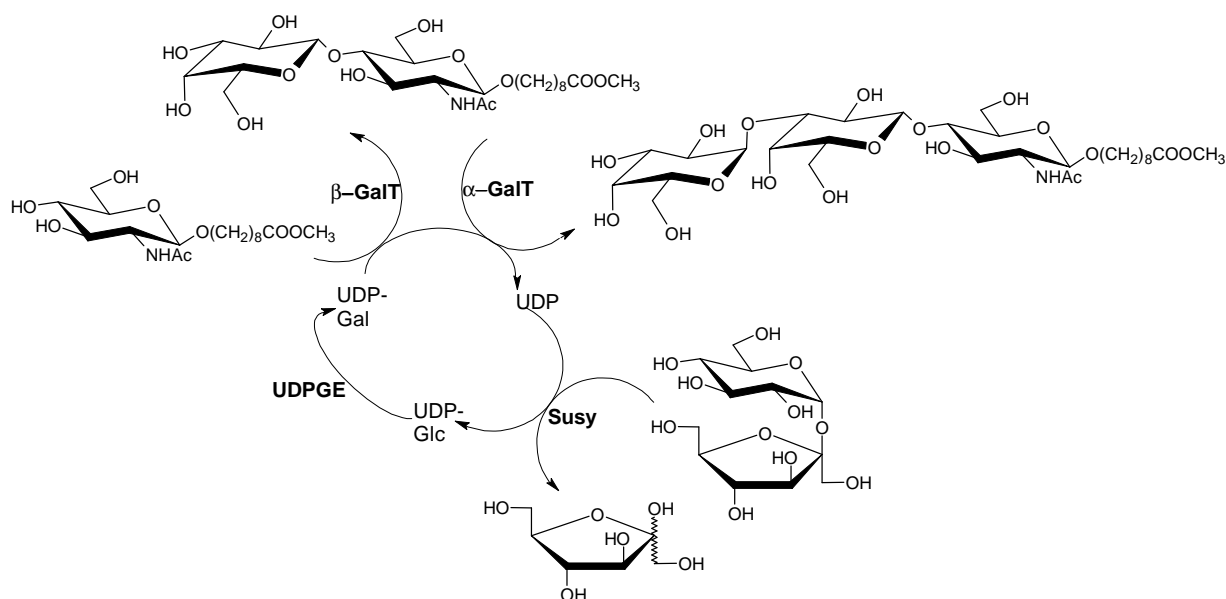
**Figura 12:** Síntese de um oligossacarídeo utilizando glicosil tricloroacetamidas e derivados 1,6-androglucose (COLLINS & FERRIER, 1995).



Na síntese enzimática de oligossacarídeos e glicosídeos, principalmente duas classes de enzimas são utilizadas: glicosiltransferases e glicosidases. Passos de síntese química ainda podem ser combinados com o uso de enzimas (AUGÉ *et al.*, 1999). A **Figura 13** mostra a obtenção de uma seqüência antigênica envolvida na rejeição de transplantes com o uso de quatro enzimas.

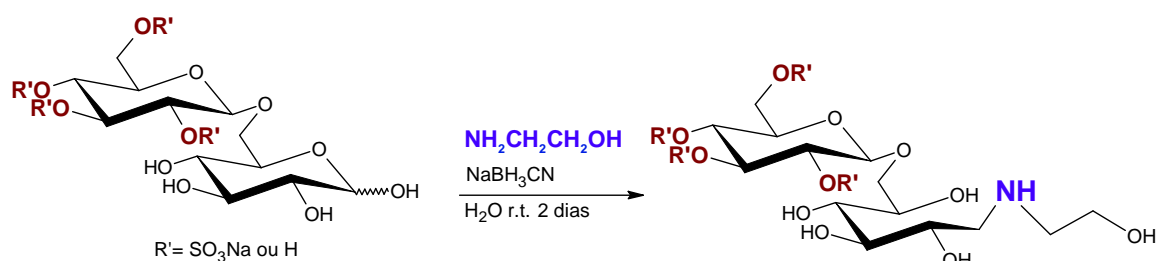


**Figura 13:** Síntese enzimática de um glicosídeo envolvido na rejeição em transplantes. Sacarose sintase: Susy;  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase:  $\alpha$ -GalT;  $\beta$ -1,4-galactosiltransferase:  $\beta$ -GalT; UDP-glucose-4'-epimerase : UDPGE (AUGÉ *et al.*, 1999).



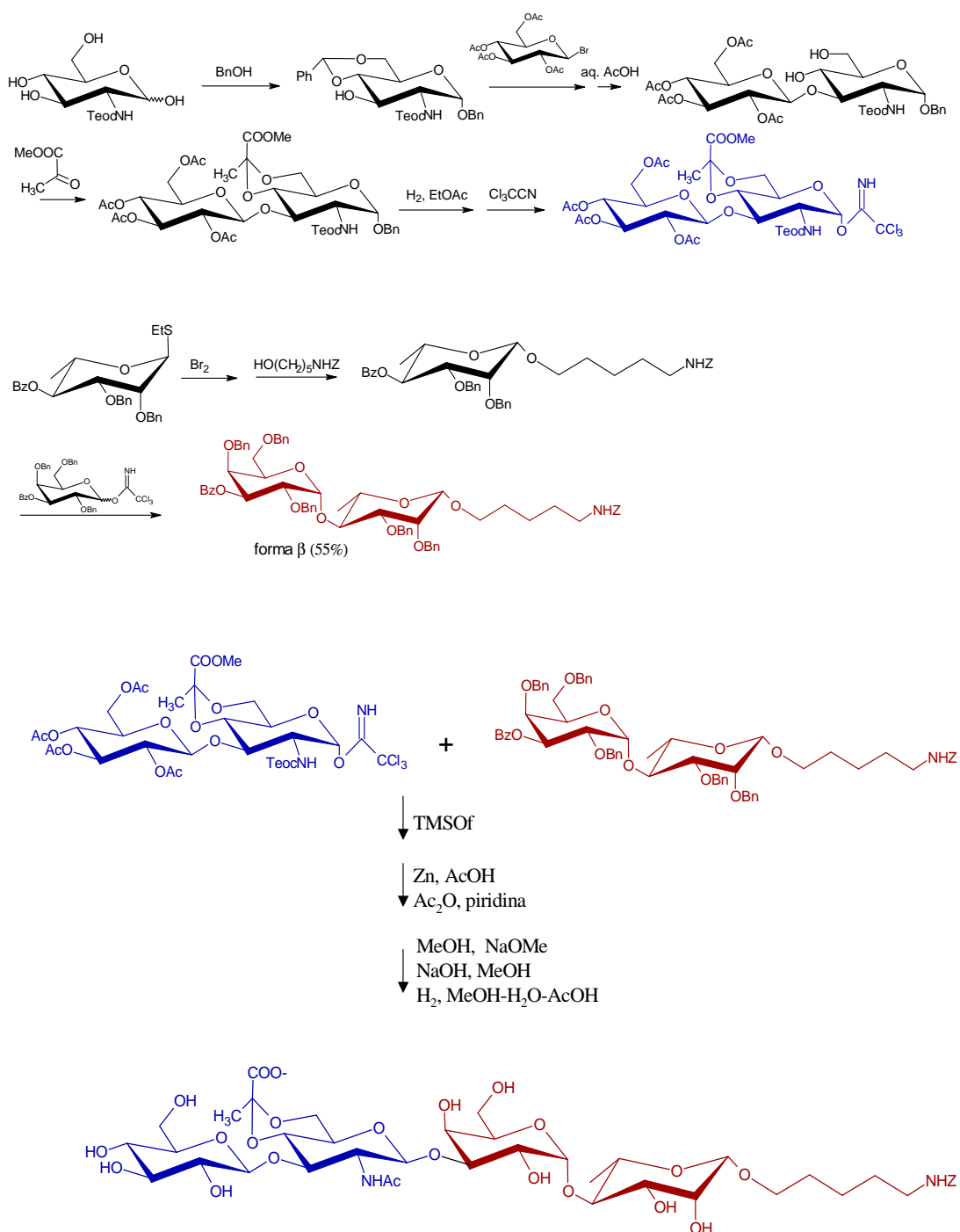
Alguns métodos sintéticos também vêm sendo empregados extensivamente para a obtenção de glicosídeos derivados de oligossacarídeos. Em muitos casos ocorre um incremento da atividade biológica do glicosídeo derivado em relação ao precursor sacarídico. A aminação redutiva é uma técnica utilizada na obtenção de glicosídeos, onde a porção açúcar pode estar previamente substituída por grupos O-sulfato (KOSHIDA *et al.*, 2001- **Figura 14**).

**Figura 14:** Exemplo de obtenção de glicosídeos a partir de oligossacarídeos através de aminação redutiva (KOSHIDA *et al.*, 2001).



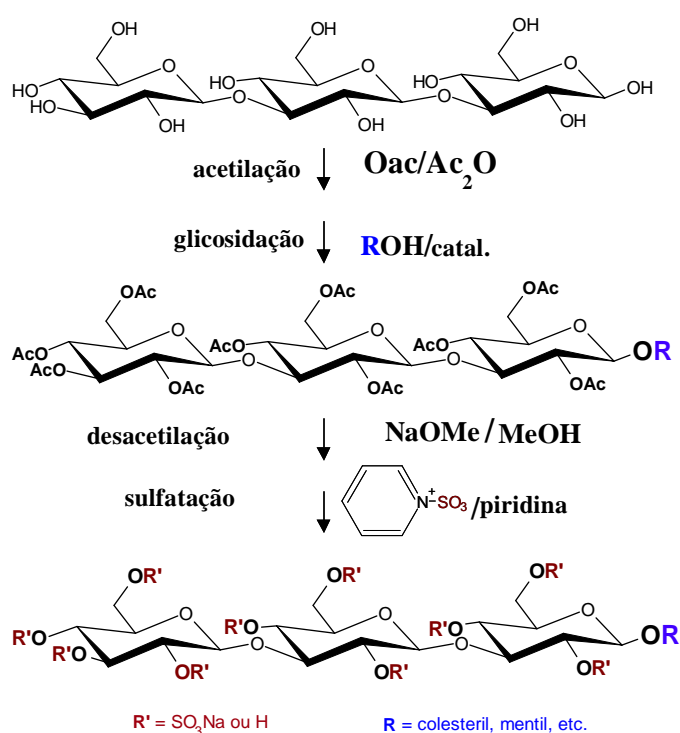
SCHÜLE & ZIEGLER (1996) sintetizaram um glicosídeo tetrassacarídico 5-aminopentil substituído por acetal de ácido pirúvico através de síntese em blocos convergentes. A estrutura obtida corresponde à unidade repetitiva do polissacarídeo capsular imunodominante de *Streptococcus pneumoniae* tipo 27 (**Figura 15**). Este, assim como outros sacarídeos sintéticos contendo grupos O-(1'-carboxietilideno), vêm sendo considerados importantes objetos para estudos imunológicos e desenvolvimento de vacinas sintéticas.

**Figura 15:** Síntese química da unidade repetitiva do polissacrídeo imunodominante de *Streptococcus pneumoniae* tipo 27 (SCHÜLE & ZIEGLER 1996).



KATSURAYA *et al.* (1999) sintetizaram alquil glicosídeos sulfatados com propriedades antivirais, partindo de oligossacarídeos neutros derivados de laminaranas. Esses glicosídeos foram sintetizados seguindo os passos de proteção das hidroxilas dos oligossacarídeos, glicosidação do terminal redutor, desbloqueio das hidroxilas e sulfatação (**Figura 16**).

**Figura 16:** Método de obtenção de alquilglicosídeos sulfatados (KATSURAYA *et al.*, 1999).

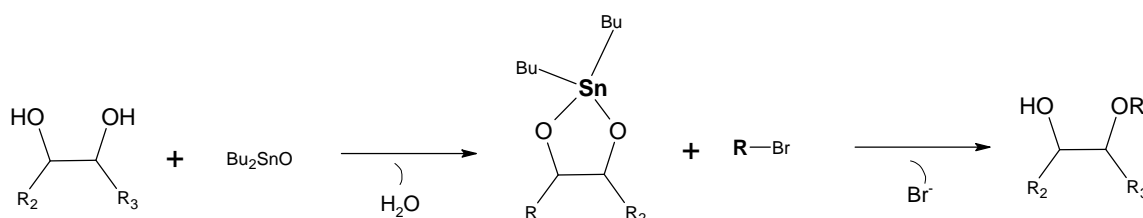


## 1.5. DERIVATIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS *via* ACETAIS DE DIALQUILESTANILENO

Reações de derivação de oligossacarídeos e outros açúcares redutores, normalmente são realizadas por reação dos terminais redutores frente a álcoois utilizando catalisadores específicos ou pelo processo de aminação redutiva para formação de bases de Schiff. Alternativamente, no caso de açúcares que não apresentam um terminal redutor, pode-se realizar reações não-anoméricas regioseletivas através da formação de intermediários acetais de dialquilestanileno.

Polióis reagem com óxido de dibutilestanho formando acetais de dibutilestanileno, e estes intermediários reagem frente a eletrófilos de maneira regioseletiva (**Figura 17** - GRINDLEY, 1998). Desde o descobrimento da utilidade de éteres trialquilestanil e dialquilestanil, estes têm sido amplamente usados em síntese de derivação de carboidratos. Avanços têm sido feitos na expansão da utilidade destes compostos bem como no entendimento dos mecanismos de reação. As maiores razões para a utilização destes intermediários, são os altos rendimentos, alta regioseletividade, e principalmente, a rapidez com que esta reações ocorrem quando comparadas as reações utilizando os álcoois precursores (GRINDLEY, 1998).

**Figura 17:** Reação de óxido de dibutilestanho com diol seguida de reação regioseletiva frente a um eletrófilo



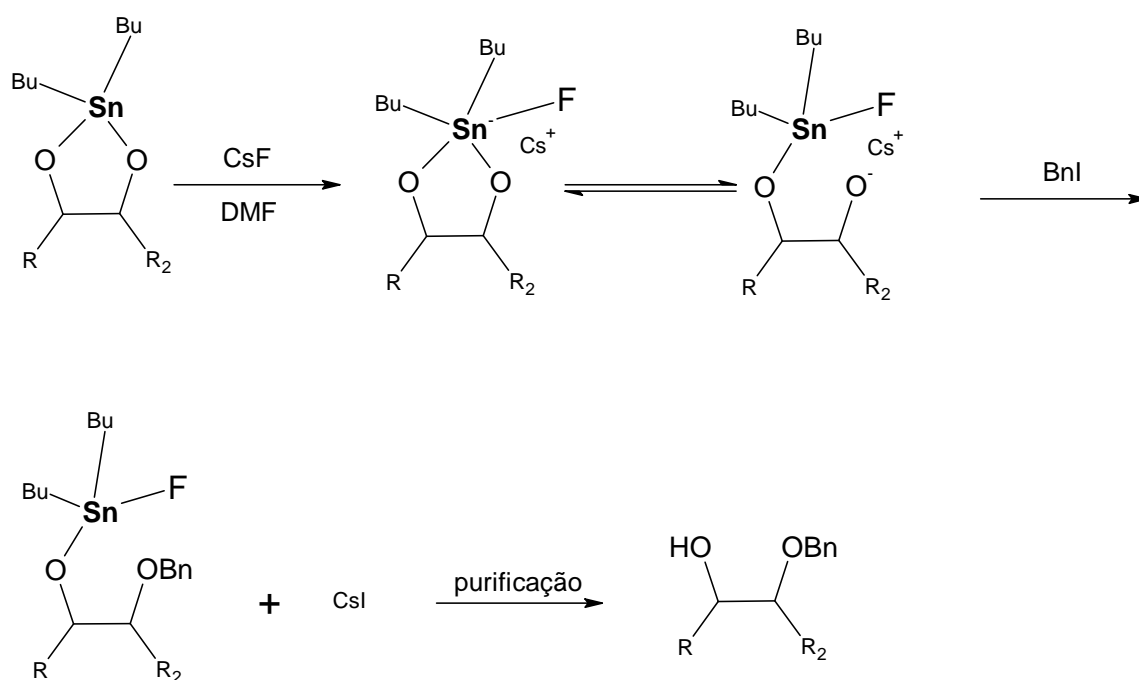
Acetais formados pela reação de carboidratos e óxido de dibutil estanho podem reagir com uma grande quantidade de eletrófilos, tais como: haletos de acila, haletos de alquila, anidridos, haletos de sulfonila, halogênios e *N*-halosuccinimidas. Estes acetais de dialquilestanileno, quando usados como intermediários para estas reações, apresentam um aumento da nucleofilicidade preferencial para um dos átomos de oxigênio envolvidos na formação do acetal, induzindo reações rápidas e regioseletivas. Durante as duas últimas décadas estes derivados têm servido como precursores para a derivatização de carboidratos, gerando principalmente derivados monossustituídos. A via normal de reação envolve a formação de uma ligação simples oxigênio-eletrófilo via unidade organo-estanho (GRINDLEY, 1998; NMAZI & GRINDLEY, 1997; GRINDLEY & NMAZI, 1996).

Nas reações de acetais de dibutilestanileno frente a eletrófilos pode utilizar-se solventes orgânicos polares como metanol, *N,N*-dimetilformamida (DMF) ou acetonitrila. Os solventes fracamente polares mais utilizados são tetraidrofurano e diclorometano. Estas reações ainda podem ser conduzidas em solventes apolares, tais como benzeno, tolueno ou brometo de benzila. As reações de acilação, sulfonilação, sulfatação e sililação são normalmente realizadas à temperatura ambiente ou sob resfriamento (GRINDLEY, 1998).

Já as reações de alquilação requerem condições mais vigorosas. Estas reações eram originalmente (NASHED & ANDERSON, 1976) conduzidas com o acetal de dibutilestanileno e agente alquilante dissolvidos em DMF à temperaturas elevadas (45 – 100 °C). Posteriormente (ALAIS & VEYRIÈRES, 1987), foi demonstrado que a adição de nucleófilos no meio reacional acelerava consideravelmente estas reações. Por exemplo, a alquilação de acetais de dibutilestanileno em benzeno, a qual é muito lenta em refluxo na presença apenas de brometo de benzila (agente alquilante), acontece muito mais rapidamente com a adição de haletos de tetrabutilamônio. Muitos outros nucleófilos, tais como, *N*-metilimidazole (CRUZADO & MARTIN-LOMAS, 1988) e fluoreto de cézio (CsF) também são efetivos. O CsF tem sido usado principalmente em DMF, sendo esta combinação extremamente efetiva para reação de benzilação com brometo de

benzila à temperatura ambiente. A **Figura 18** mostra o mecanismo de reação proposto por NAGASHIMA e OHNO (1991) para as reações de alquilação na presença de CsF.

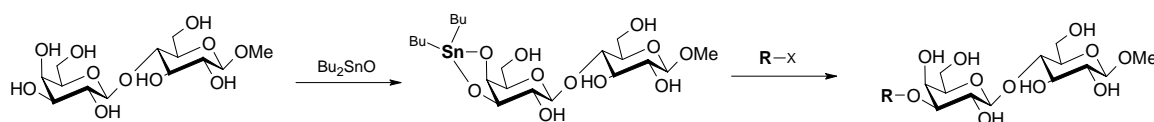
**Figura 18:** Mecanismo proposto para a participação do CsF em reações de acetais de dibutilestanileno (NAGASHIMA & OHNO, 1991).



### 1.5.1. Correlação entre a estrutura de acetais de dialquilestanileno e regioseletividade.

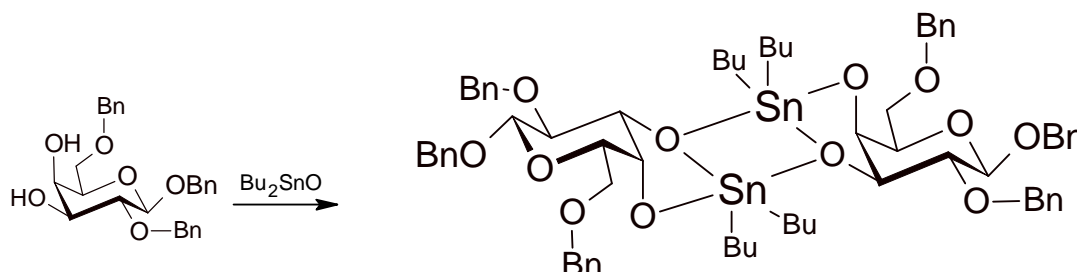
Em acetais de dibutilestanileno formados num par equatorial-axial *cis*-diol em anéis piranosídicos, a reação ocorre preferencialmente no oxigênio equatorial. Os exemplos mais espetaculares de regioseletividade para este tipo de formação têm sido demonstrados em monossustituições seletivas do O-3 em  $\beta$ -lactosídeos (**Figura 19**), os quais apresentam 7 hidroxilas livres incluindo duas primárias (ALAIS *et al.*, 1983; EKBERG & MAGNUSSON, 1993; FERNÁNDEZ *et al.*, 1994).

**Figura 19:** Monossustituição em O-3 do metil  $\beta$ -lactosídeo



A **Figura 19** representa o intermediário acetal de dibutilestanileno como uma estrutura monomérica. Entretanto, o estudo destes acetais derivados de carboidratos demonstrou que estes compostos apresentam-se principalmente na forma de dímeros em solução (**Figura 20** – DAVID *et al.*, 1981; GRINDLEY & THANGARASA, 1990).

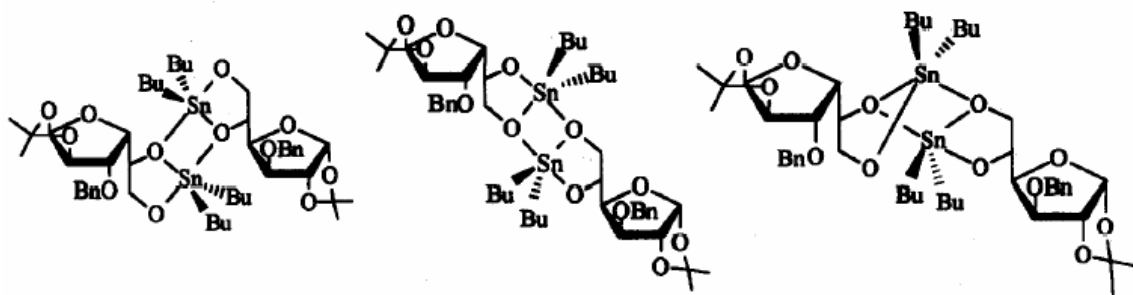
**Figura 20:** Estrutura dimérica do acetal de dibutilestanileno do benzil 2,6-di-O-benzil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo



Para os acetais dibutilestanileno formados num par diol terminal contendo um oxigênio primário e outro secundário, a reação ocorre preferencialmente no átomo de oxigênio primário com excelente regiosseletividade, o que pode ser explicada pela estrutura dimérica que estes acetais assumem em solução. A **Figura 21** mostra a formação dos dímeros possíveis de acetais dibutilestanilenos em estruturas contendo terminais 1,2-diois (GRINDLEY & KONG, 1993).



**Figura 21:** Estruturas diméricas possíveis de acetais de dibutilestanileno de 3-O-benzil-1,2-O-isopropilideno-D-glucufuranose; a partir da esquerda: espécie 5,5-dimérica, 6,6-dimérica e 5,6-dimérica.



Sabendo que os oxigênios dicoordenados são mais nucleofílicos que os tricoordenados e, que os dicoordenados primários são mais reativos que os dicoordenados secundários, fica clara a tendência regioseletiva em relação à posição primária, apesar do equilíbrio entre as três espécies estar deslocado para forma 6,6-dimérica, onde os oxigênios secundários seriam favorecidos (**Figura 21**). O que favorece a substituição primária é a mobilidade apresentada pelos grupos butil, o que possibilita a interconversão para as outras espécies possíveis. Deste modo, o ataque aos oxigênios primários é favorecido devido a sua mais alta reatividade (GRINDLEY & KONG, 1993; KONG & GRINDLEY, 1994a).

Apesar disso, já foi reportado que para acetais hexametilenoestânileno, a reação é deslocada ao oxigênio secundário. Esta marcada mudança na regioseletividade pode ser explicada pela menor mobilidade dos grupos hexametileno em relação aos grupos butil. Deste modo, na conversão para as espécies 5,5-diméricas e 5,6-diméricas (onde há possibilidade de dicoordenação nas hidroxilas primárias) é desfavorecida (GRINDLEY & KONG, 1993; KONG & GRINDLEY, 1994).

### 1.5.2. Estudo da estrutura de acetais de dialquilestanileno por RMN de $^{119}\text{Sn}$

A RMN de  $^{119}\text{Sn}$  é a técnica mais conveniente para o estudo de compostos organo-estanho em solução. O núcleo de  $^{119}\text{Sn}$  tem *spin* de  $\frac{1}{2}$  e abundância isotópica de 8,7%. Deste modo, RMN de  $^{119}\text{Sn}$  é 25,5 vezes mais sensível que RMN de  $^{13}\text{C}$  (KENNEDY & McFARLANE, 1988).

Os átomos de estanho em acetais de dibutilestanileno ressonam normalmente na região entre -100 até -200 ppm. Esta é a região do espectro onde átomos de estanho na forma de dibutildialcoxiestanho absorvem, se o átomo de estanho é pentacoordenado (GRINDLEY, 1998), ou seja, quando estes compostos estão na forma de dímeros (observar coordenação do núcleo de estanho nas **Figuras 20 e 21**). Para átomos de estanho tetracoordenados, a absorção ocorre de -40 até +100 ppm, enquanto os hexacoordenados absorvem entre -230 e -300 (GRINDLEY & THANGARASA, 1990; GRINDLEY *et al.*, 1992a; GRINDLEY *et al.*, 1992b).

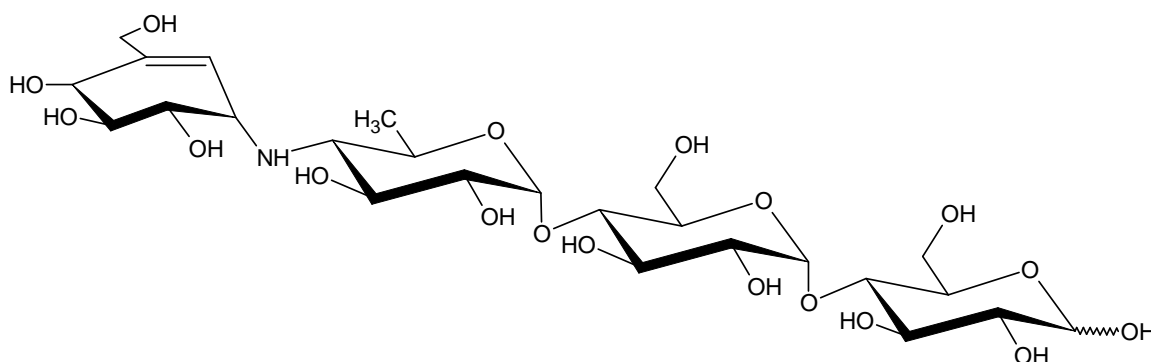
RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  são muito menos úteis do que RMN de  $^{119}\text{Sn}$  em termos de informações estruturais sobre estes compostos. Isto porque o deslocamento químico de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  provocado pela coordenação de um núcleo de estanho normalmente é muito pequeno ( $\sim 4$  ppm) e na maioria das vezes não é restrito ao carbono ou próton adjacente ao oxigênio coordenado. Entretanto, experimentos de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  mono- e bidimensionais tem-se mostrado extremamente úteis no estudo dos mecanismos de reação envolvendo compostos organo-estanho (HOLECEK *et al.*, 1986).

## 1.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA DE GLICÍDEOS

Têm-se atribuído atividade biológica importante a alguns tipos de oligossacarídeos e glicosídeos. Atividades hipoglicemiante (JOUBERT *et al.*, 1987), antiviral (KATSURAYA *et al.* 1999) e antiangiogênica (PARISH *et al.*, 1999; KÄSBAUER *et al.* 2001) são algumas das propriedades já descritas para oligossacarídeos naturais, oligossacarídeos obtidos por hidrólise parcial, glicosídeos sintéticos e semi-sintéticos. A atividade parece estar intimamente ligada ao número de unidades monossacarídicas presentes no oligossacarídeo, com os substituintes destas unidades e com a porção aglicona (no caso de glicosídeos) ligada à estrutura (HURTLEY, *et al.* 2001).

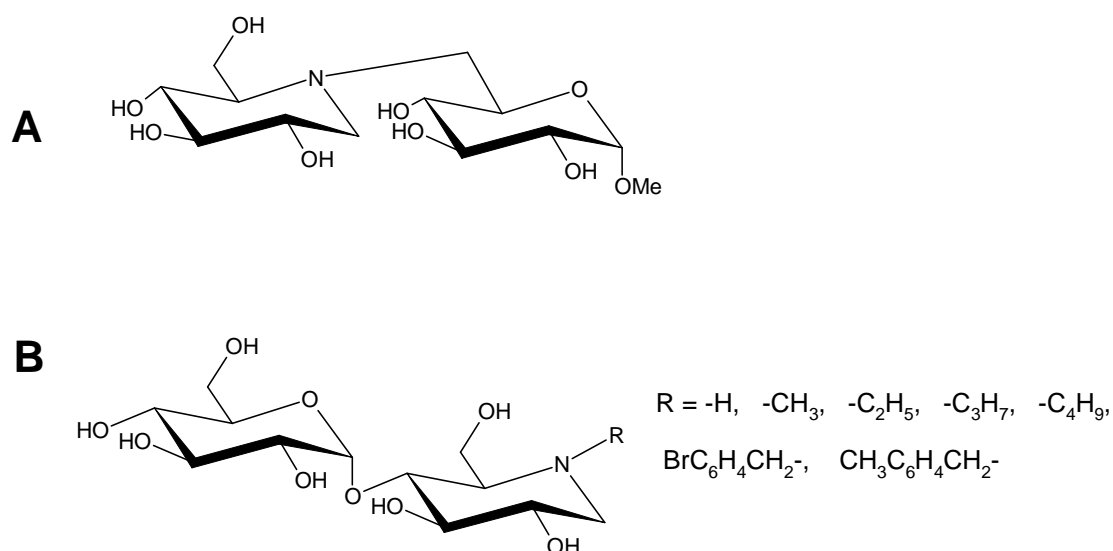
A ascarbose (**Figura 22**) foi introduzida na terapêutica em 1990 (Bayer AG®, Alemanha) com o nome de fantasia de Glucobay®. Este oligossacarídeo, isolado de espécies da actinobactéria *Actinoplanes*, vem sendo utilizado na terapêutica do Diabetes melitus do tipo II (não dependente de insulina). Funciona como inibidor competitivo de várias enzimas intestinais:  $\alpha$ -glucosidases, glucoamilase, sucrase, maltase e isomaltase. Deste modo, impede a formação de glucose livre no intestino e, conseqüentemente, diminui seus níveis séricos. Em adição, a ascarbose não inibe a lactase, evitando a intolerância à lactose (WITCZAK, 1997).

**Figura 22:** Estrutura da ascarbose, oligossacarídeo hipoglicemiante inibidor de glucosidases intestinais (WITCZAK, 1997).



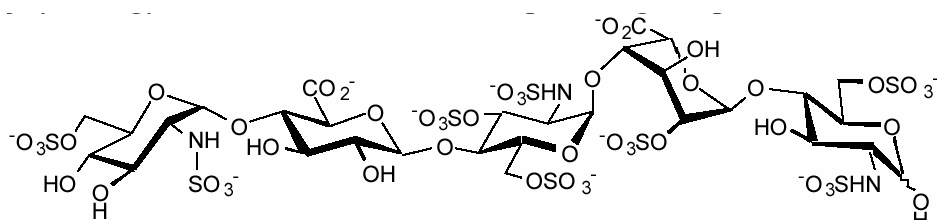
Além da ascarbose, o dissacarídeo MDL 73945 e as glucopiranosilmoranolinas (**Figura 23**) apresentam-se como inibidores potentes e seletivos das  $\alpha$ -glucosidases intestinais, promovendo um efeito hipoglicemiante de longa duração. Estes azadissacarídeos (N no anel piranosídico), são estruturas relativamente simples, servindo como modelos atrativos para o *design* de novos agentes antidiabéticos (WITCZAK, 1997).

**Figura 23:** Oligossacarídeos hipoglicemiantes: (A) dissacarídeo MDL 73945 e (B) glucopiranosilmoranolinas (WITCZAK, 1997).



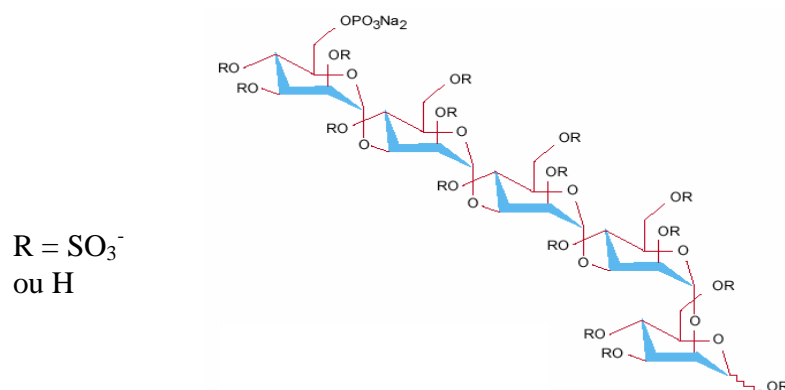
O pentassacarídeo sintético SR90107A (**Figura 24**), que representa a sequência mínima ligante da antitrombina III, tem servido como modelo para um grande número de oligossacarídeos sulfatados sintéticos com diferentes afinidades por antitrombina III para testes de atividade anticoagulante (LORMEAU *et al.*, 1997).

**Figura 24:** Oligossacarídeo SR90107A: seqüência mínima ligante da antitrombina III.



WALL *et al.* (2001) estudaram 17 estruturas oligossacarídicas sulfatadas em relação a sua atividade anticoagulante sendo que nove destas estruturas apresentaram atividade significativa. O tipo de ligação glicosídica, constituição monossacarídica e índice de sulfatação mostraram-se fatores críticos para esta atividade. Neste trabalho o oligossacarídeo sulfatado denominado PI-88, correspondente à fosfomanopentose sulfato (**Figura 25**), demonstrou os melhores resultados. Curiosamente esta estrutura parece agir aumentando o cofator 2 da heparina ao invés de ligar a antitrombina III.

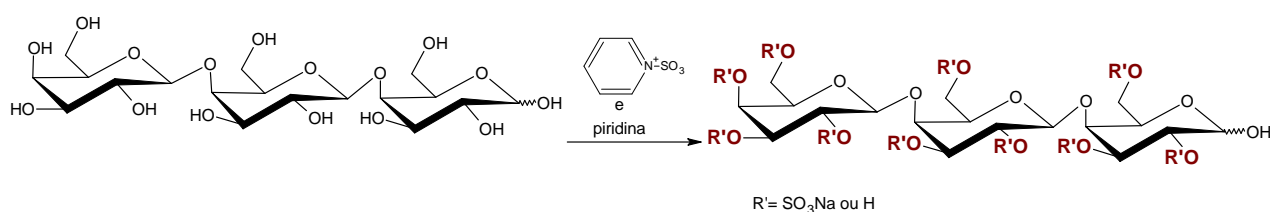
**Figura 25:** Estrutura química do oligossacarídeo PI-88 (fosfomanopentose sulfato - PARISH *et al.*, 1999).



O oligossacarídeo PI-88 também demonstrou uma importante propriedade antiangiogênica e anti-heparanase. Sua atividade anti-tumoral foi estudada detalhadamente, sendo demonstrado: inibição de crescimento de adenocarcinoma mamário de rato, altamente invasivo (13762 MAT), diminuição da vascularidade de tumores e uma potente inibição de metástase carregada por sangue (PARISH *et al.*, 1999). O PI-88 foi patenteado pela Progen Industries Limited (Austrália), apresentando eficácia nos estudos pré-clínicos, fase I de triagem clínica completa (apresentou 100% de biodisponibilidade quando administrado por via subcutânea) e recentemente (2003) teve eficácia comprovada na fase II de triagem clínica sob supervisão do FDA (*Food and Drug Administration – USA*).

Oligossacarídeos quimicamente sulfatados constituídos por  $\beta$ -Galp (1 $\rightarrow$ 4) (**Figura 26**), com diferentes graus de polimerização, demonstraram ação antiangiogênica através da interação com FGF-2, fator de crescimento de fibroblastos (KÄSBAUER *et al.*, 2001).

**Figura 26:** Oligossacarídeos quimicamente sulfatados constituídos por  $\beta$ -Galp- (1 $\rightarrow$ 4) com potencial atividade antigênica (KÄSBAUER *et al.*, 2001).



## **1.7. CARBOIDRATOS SULFATADOS E ATIVIDADE ANTIVIRAL**

No início dos anos 60 foi demonstrado que a heparina e outros compostos polianiônicos agem como inibidores do vírus causador do Herpes simplex (HSV). Logo após a identificação do vírus imunodeficiência humana (HIV) como causador da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) em 1984, a heparina e outros polissulfatos, também mostraram-se como potentes inibidores da replicação do HIV em cultura de células. A partir destas constatações, vem sendo demonstrado que os polissulfatos exibem seu espectro de ação frente a vários vírus envelopados, tais como: HSV-1, HSV-2 (vírus da Herpes simplex do tipo 1 e 2, respectivamente), citomegalovírus, togavírus, arenavírus, rabdovírus (causador de estomatite vesicular), vírus Influenza A e vírus sincicial respiratório (WITVROUW *et al.*, 1997).

Muitos polissacarídeos sulfatados têm sido preparados para realização de testes de atividade antiviral. Compostos como dextrana sulfato, pentosana sulfato e ciclodextrinas sulfatadas vêm sendo obtidos através de extração, purificação e sulfatação. Diversos derivados da heparina também vêm sendo utilizados: heparina oxidada e peroxidada (cadeia de 6 a 30 unidades monossacarídicas), derivados O-acilados e carboxiesterificados, além da própria heparina, têm sido extensivamente investigados no que concerne à atividade antiviral. Polissacarídeos naturalmente sulfatados, tais como, dermatana sulfato e polissacarídeos de algas marinhas, também vêm sendo empregados nestes estudos (WITVROUW *et al.*, 1997).

### **1.7.1. Carboidratos sulfatados: relação entre estrutura e atividade antiviral.**

Polissacarídeos sulfatados têm demonstrado diferenças marcantes em relação à atividade anti-HIV, dependendo da estirpe do vírus e do tipo de célula utilizada no ensaio. As dextranas e pentosanas sulfato têm um maior poder inibitório em relação à estirpe HIV-2 (ROD) quando comparadas suas atividades frente aos HIV-1 e HIV-2 (EHO). A heparina e seus derivados apresentam uma

menor atividade contra as estirpes de HIV-2, principalmente em relação aos derivados oxidados (SCHOLS *et al.*, 1992; WITVROUW *et al.*, 1997).

Estes e outros achados revelam que os poliânions interagem com diferentes regiões do envelope viral do HIV. Já as diferenças de atividade entre diferentes tipos de células utilizadas nos ensaios, mostram a possibilidade de interferência por fatores celulares, como por exemplo, variantes de receptores CD4 (WITVROUW *et al.*, 1997).

Experimentos utilizando ciclodextrinas e dextranas sulfato com massas moleculares e índice de sulfatação crescentes têm demonstrado que a atividade antiviral aumenta diretamente em função do aumento destas características. Apesar desta constatação, existe somente um aumento marcado da atividade anti-HIV-1 a partir de dextranas sulfato de 1.000 até 10.000 de massa molecular. Aumentando-se a massa além destes valores (10.000 – 50.000), a atividade tende a manter-se inalterada. Já em relação ao HIV-2, dextranas sulfato com massa molecular de 1.000 mostraram-se mais ativas que as de mais alta massa molecular (SCHOLS *et al.*, 1992; WITVROUW *et al.*, 1997).

O conhecimento referente à relação estrutura-atividade de antivirais polissulfatos, diz respeito ao grau de polimerização e índice de sulfatação dos compostos testados. A influência exercida pelo posicionamento do grupo sulfato, e conseqüentemente, a disposição que estes ocupam no espaço, vêm sendo estudada de forma mais decisiva somente nos últimos anos.

SHUKLA, *et al.* (1999) demonstraram que o HSV-1 liga-se à célula através de interações das glicoproteínas virais gB e gC com cadeias de heparan sulfato de proteoglicanas de superfície celular. Esta ligação não se mostrou suficiente para a entrada do vírus, o que requer uma fusão entre o envelope viral e a membrana da célula. A D-glucosaminil 3-O-sulfotransferase promove uma sulfatação específica para gerar o sítio de ligação de uma terceira glicoproteína viral, gD, que inicia a entrada do HSV-1. Com isso, foi demonstrado que a entrada do HSV-1 depende da presença das cadeias de heparan 3-O-sulfatadas em resíduos específicos de glucosamina. Mais recentemente, um octassacarídeo 3-O-sulfatado num resíduo de glucosamina, derivado do heparan, demonstrou ter



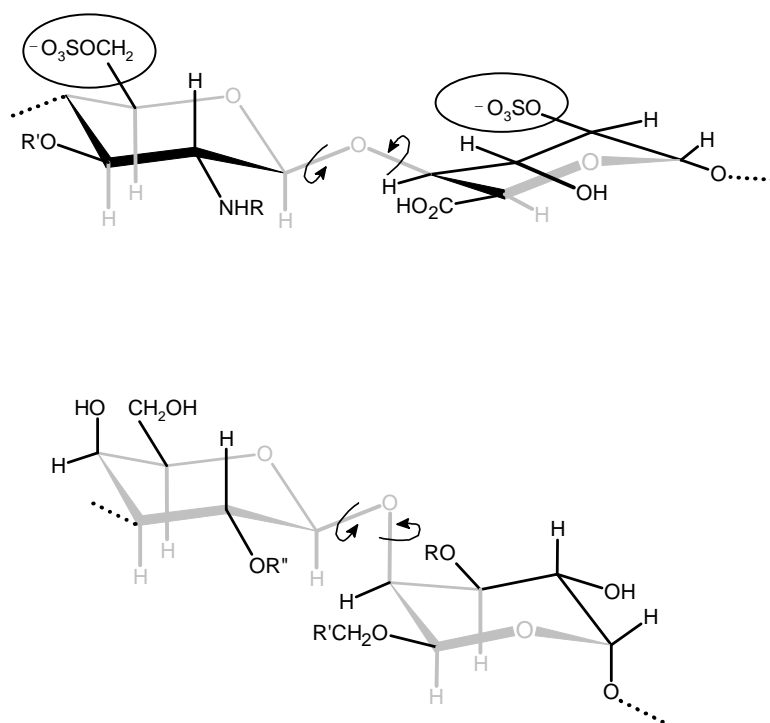
afinidade de ligação a glicoproteína gD. A análise estrutural deste oligossacarídeo indicou que tratava-se de um octassacarídeo heptassulfatado com a seguinte estrutura:  $\Delta$ UA-GlcNS-IdoUA2S-GlcNAc-UA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNH<sub>2</sub>3S6S (LIU *et al.*, 2002).

Ainda, vários estudos têm comprovado a atividade anti-HSV-1 inerente a galactanas naturalmente sulfatadas extraídas de algas vermelhas. CARLUCCI *et al.*, (1997), DUARTE *et al.*, (2001a), DUARTE *et al.*, (2001b) e DUARTE *et al.*, (2004) demonstraram que a especificidade de posicionamento dos grupos sulfato nestas galactanas é diretamente relacionada ao nível de atividade antiviral.

Agaranas altamente 2-O-sulfatadas (unidade **A**) e 6-O-sulfatadas (unidade **B**), obtidas a partir da alga vermelha *Acanthophora spicifera*, apresentaram alta atividade anti-HSV-1. O padrão de sulfatação apresentado por estes polissacarídeos permite que suas unidades dissacarídicas possam assumir uma conformação equivalente à sequência mínima do heparan sulfato (DUARTE *et al.*, 2004).

Quando modelos moleculares de zonas de ligações iônicas mínimas são examinados com os grupos 2-O- e 6-O-sulfato direcionados para o mesmo lado da molécula, estes apresentam superfícies mais ou menos hidrofóbicas devido a ligações C-H axiais e orbitais com pares de elétrons não compartilhados (**Figura 27**). A acomodação das cargas negativas e das superfícies hidrofóbicas do polissacarídeo durante a ligação com a glicoproteína gC pode ser otimizada pela rotação das unidades de açúcar, através da rotação da ligação glicosídica. A simultaneidade das forças iônicas e hidrofóbicas na formação do complexo polissacarídeo sulfatado-superfície viral resulta num efeito sinérgico de estabilização (DUARTE *et al.*, 2004).

**Figura 27:** Estruturas mínimas ligantes no heparan sulfato (acima) e em agaranas sulfato (abaixo). As zonas hidrofóbicas estão indicadas em cinza e as zonas iônicas estão circuladas. As setas indicam as possibilidades de rotação em relação às ligações glicosídicas. Para o heparan sulfato  $R' = H$  indica estrutura mínima ligante para glicoproteína gC;  $R' = SO_3^-$ , estrutura mínima ligante para glicoproteína gD. Para as agaranas sulfato  $R = H$ ,  $R' = SO_3^-$  e  $R'' = SO_3^-$  indica estrutura mínima ligante de gC;  $R = SO_3^-$ ,  $R' = SO_3^-$  e  $R'' = SO_3^-$ , estrutura mínima ligante de gD (DUARTE *et al.*, 2004).



Deste modo, a maior atividade anti-HSV-1 apresentado por fucanas quando comparadas a carragenanas e dextranas sulfato, pode ser explicada pelo caráter hidrofóbico apresentado pelas unidades de fucose (C-6 desoxihexose).

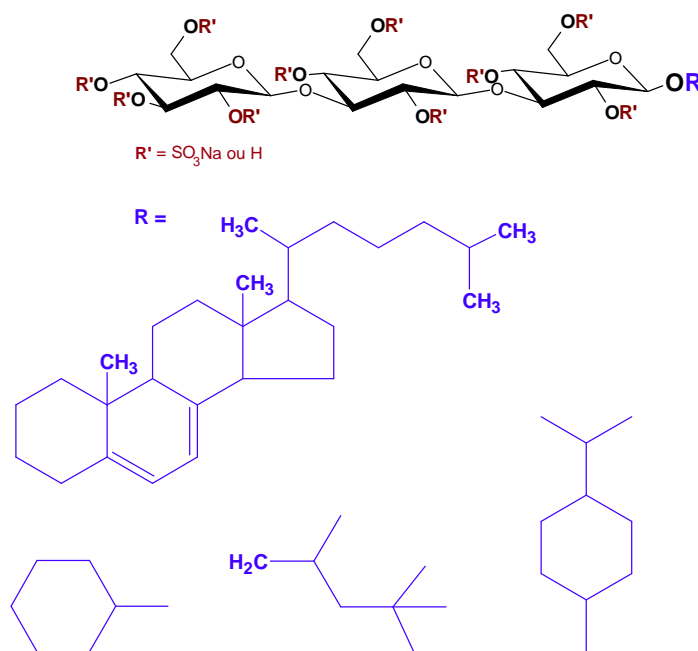
A relação entre a atividade anti-HSV-1 e a presença de fatores hidrofóbicos nos polissulfatos pode ser explicada pela presença de grupo de aminoácidos hidrofóbicos na porção *N*-terminal da glicoproteína gC. HOSOYA *et al.* (1991) reportaram que todas as retrovíroses e mixovíroses sensíveis a polissulfatos

compartilham de uma região tripeptídica hidrofóbica (Phe-Leu-Gly) em suas glicoproteínas externas, enquanto vírus resistentes não possuem esta seqüência.

A princípio, oligossacarídeos sulfatados, exibem pequena ou nenhuma atividade antiviral, uma vez que este tipo de propriedade está diretamente relacionada a longas cadeias polianiónicas. Uma exceção a esta regra é a suscetibilidade do vírus HIV-2 (ROD) ao sucralfato (sacarose persulfatada) e à heparinas de baixa massa molecular. Já estirpes de HIV-1 e outros vírus sensíveis a polissulfatos mostram-se insensíveis a carboidratos sulfatados de baixo grau de polimerização (SCHOLS *et al.*, 1992; WITVROUW *et al.*, 1997).

Entretanto, resultados obtidos por KATSURAYA *et al.* (1999) mostram que oligossacarídeos sulfatados ligados a longas cadeias alquila (alquil glicosídeos- **Figura 28**) têm uma alta atividade anti-HIV-1. O efeito anti-HIV aumenta com o índice de sulfatação e com a hidrofobicidade proporcionada pelo radical alquila ligado. Nos ensaios em que foram determinados o efeito citotóxico (CC50) e a atividade antiviral (EC50), foi reportado que a EC50 mostrou-se várias vezes menor que a CC50. O tipo do mecanismo antiviral proposto seria a interação da porção oligossacarídica sulfatada com a glicoproteína gp120 localizada no envelope do vírus HIV-1. Este achado comprova que o fator hidrofobicidade pode ser mais decisivo que características poliméricas na atividade antiviral de moléculas sulfatadas.

**Figura 28:** Representação dos alquiloligossacarídeos quimicamente sulfatados com alta atividade anti-HIV-1.



Os polissacarídeos encontrados em algas marinhas podem apresentar-se naturalmente substituídos por grupos O-sulfato, deste modo podem ser utilizados como fontes de oligossacarídeos para a posterior produção de alquil glicosídeos com potencial biológico.

Muitos dos oligossacarídeos sulfatados com atividade biológica descritos na literatura não têm o posicionamento do grupo sulfato definido (devido a sulfatação química - KATSURAYA *et al.* 1999; PARISH *et al.*, 1999; KÄSBAUER *et al.* 2001). Portanto, a obtenção de oligossacarídeos a partir de polissacarídeos de algas marinhas, onde as posições dos grupos sulfato são mais específicas, pode ser uma ferramenta importante para a determinação da relação estrutura-atividade.

De acordo com a alga produtora, o posicionamento de grupos O-sulfato de galactanas de algas vermelhas pode variar (ex: *kappa*-carragenana, sulfato em C-

4- em *Kappaphycus alvarezii*; iota-carragenana, sulfato em C-4 e C-2 em *Eucheuma denticulatum*; agarose-6-sulfato em *Gracilaria domingensis*). Desta forma, de fontes distintas, pode-se obter vários modelos oligossacarídicos no que concerne não somente ao padrão de substituição por grupos sulfatos, mas também em relação a outros substituintes (acetal de ácido pirúvico, grupos O-metil) e enantiomericidade D e L das unidades **B** de oligossacarídeos derivados de carragenanas e agaranas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL:**

- Obtenção de oligossacarídeos com padrões de substituição definidos e estudo de derivatizações químicas relevantes na área biológica.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Produção, fracionamento e purificação de modelos oligossacarídicos redutores e não redutores obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas.
- Monitoramento e adaptação de métodos hidrolíticos através do uso de eletroforese capilar (EC) para produção de oligossacarídeos com variados graus de polimerização
- Inserção de grupos hidrofóbicos e/ou ácidos nos oligossacarídeos obtidos através da química de organo-estanho;
- Determinação estrutural dos oligossacarídeos e glicosídeos obtidos utilizando métodos químicos, espectroscópicos e espectrométricos;
- Estudo da atividade antiviral (anti-HSV) dos oligossacarídeos nativos e quimicamente modificados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

As algas vermelhas *Kappaphycus alvarezii*, *Gigartina skottsbergii* e *Gracilaria domingensis* foram submetidas à lavagem em água corrente, limpas manualmente, secas ao sol, e moídas em moinho de facas. Cada material foi então submetido à extração aquosa (15 g%) a 65 °C. O extrato, após centrifugação, foi tratado com 3 volumes de etanol. Os polissacarídeos precipitados foram dissolvidos em água, submetidos à diálise e liofilizados. Os materiais polissacarídicos provenientes destas algas foram então submetidos a tratamento alcalino (NOSEDA & CEREZO, 1995) para completa ciclização das unidades de  $\alpha$ -galactopirranose sulfatadas em carbono-6.

A alga *Acanthophora spicifera* foi submetida a três extrações (15 g%) consecutivas a 80 °C. Os três extratos foram combinados, processados e submetidos a tratamento alcalino, como anteriormente descrito (GONÇALVES, 2001). Parte do primeiro extrato a quente foi reservado e submetido à purificação através de precipitação com KCl 2M. Esta fração purificada também foi submetida a tratamento alcalino.

A agarose comercial Tipo I também foi utilizada nestes estudos, sendo a mesma adquirida da Sigma®.

#### 3.2. PRODUÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

##### 3.2.1. Hidrólise redutiva parcial

Os polissacarídeos processados por tratamento alcalino foram submetidos a hidrólise redutiva parcial de acordo com o método de USOV e ELASHVILI (1991), onde o polissacarídeo é hidrolisado em TFA 0,5 M na presença do complexo 4-metilmorfolina borano (4-MMB) por 8 horas (4 horas para agarose comercial) a 60°C; após o término da hidrólise o TFA é codestilado com água

destilada. Este tipo de hidrólise parcial favorece a quebra das ligações 3,6-anidrogactosídicas, preservando as demais ligações glicosídicas da molécula, com concomitante redução do terminal gerados durante a hidrólise, produzindo oligossacarídeos na forma de alditóis.

### **3.2.1. Hidrólise parcial**

Alternativamente, foi realizada hidrólise de agarose comercial com HCl concentrado por 30 min, à temperatura ambiente, sendo a reação interrompida com bicarbonato de sódio (YANG *et al.*, 2001).

## **3.3. FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS**

### **3.3.1. Cromatografia de troca iônica:**

Os experimentos de cromatografia de troca iônica foram realizados em coluna contendo DEAE-Sephadex A-25 (Cl<sup>-</sup>), eluindo-se a amostra primeiramente com água e posteriormente com gradiente contínuo ou descontínuo de NaCl. A detecção dos açúcares foi feita pelo método de DUBOIS *et al.* (1956).

### **3.3.2. Cromatografia de filtração em gel:**

Esta cromatografia foi realizada em coluna contendo Bio-Gel P-2 (faixa de exclusão: 1800 -100 daltons) e Sephadex G-25 (faixa: 5000 - 600) utilizando-se como eluente água destilada. A detecção foi feita como no item 3.3.1.

### **3.3.3. Cromatografia em sílica:**

As cromatografias de camada delgada (CCD) foram realizadas em Sílica Gel em folhas de alumínio 60 F254 (Silicycle) usando misturas de solventes



medidas em base de v/v. Após cromatografia, os açúcares foram visualizados através de borrifamento com solução de orcinol 0.5% em etanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (20/1) e aquecimento até o aparecimento de coloração. Para purificação preparativa dos compostos utilizou-se cromatografia em coluna de sílica sob pressão (“dry flash chromatography”) em Sílica Gel de grau CCD 60 (Silicycle).

#### **3.3.4. Extração dos oligossacarídeos com dimetilsulfóxido (DMSO):**

Quando a quantidade de sais impedia a utilização da filtração em gel, o processo de “desalting” foi realizado através da extração dos oligossacarídeos com uso de DMSO e posterior precipitação com clorofórmio 3 volumes (YANG *et al.*, 2001).

#### **3.3.5. Purificação do produto de hidrólise redutiva parcial com uso de solventes orgânicos:**

Na hidrólise redutiva parcial da agarose comercial foi utilizada uma técnica alternativa de purificação dos produtos de hidrólise. Após a remoção do TFA e evaporação do meio reacional até a secura, o resíduo foi ressuspenso em metanol com subsequente filtração. O filtrado foi submetido a redução de volume sob pressão reduzida, sendo posteriormente adicionado 10 volumes de acetato de etila sobre a solução metanólica concentrada. A suspensão resultante foi reservada por uma hora para obtenção do precipitado através de centrifugação. O *pellet* obtido foi cromatografado em sílica com 8:2:1 (acetato de etila:metanol:água) para obtenção dos oligossacarídeos completamente purificados.

### **3.4. ELETROFORESE CAPILAR**

O processo de hidrólise redutiva parcial foi monitorado através da retirada de alíquotas em diferentes tempos de hidrólise. A estas alíquotas foram

adicionados 2 volumes de água destilada seguindo-se de congelamento e liofilização. Para eliminação do 4-metil-morfolina borano, foi adicionado às amostras, resina catiônica DOWEX (forma protônica), ficando a mistura sob agitação durante 30 min. Em seguida a mistura foi filtrada, congelada e liofilizada. A possível existência de materiais insolúveis no meio exigiu a ressuspensão do liofilizado em 200 µL de água destilada para centrifugação em *eppendorfs*, de onde seus sobrenadantes foram diretamente submetidos à eletroforese capilar.

Para as análises eletroforéticas, foi utilizado o equipamento Beckman 5010 PACE em tampão constituído de 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS e 20 mM de borato em pH 10 e submetido a 10 kV na temperatura de 45°C. As dimensões do capilar correspondem a 50 cm de comprimento e 50 µm de diâmetro interno. A detecção indireta por UV teve como co-íon detectável o ácido *p*-toluenossulfínico a 214 nm.

### 3.5. SÍNTESE E MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS METILGALACTOSÍDEOS

#### 3.5.1. Preparação de β-D-Galp pentaacetato

Uma suspensão de 5 g de acetato de sódio (0,0609 mol) em 70 mL (0,7404 mol) de anidrido acético foi aquecida em chama até ebulição em um balão de fundo redondo, seguido de adição de 300 mg de D-galactose. A mistura resultante foi mantida sob suave agitação até o consumo completo do açúcar adicionado (desaparecimento do precipitado branco). Pequenas porções de D-galactose foram gradativamente adicionadas evitando o acúmulo de sólidos com o uso esporádico de chama para a ativação da reação. Após a adição da quantidade total de açúcar (10 g ou 0,0555 mol), a solução resultante foi levada a ebulição total por alguns segundos seguido de adição de 200 ml de gelo moído. A suspensão resultante foi mantida em repouso por 3 h e o produto desejado foi obtido como cristais através de filtração a vácuo e lavagem com água destilada gelada. O produto ainda foi recristalizado em 100 ml de etanol 95% a quente e

filtrado através de funil contendo carvão ativado. Após purificação,  $\beta$ -D-Galp pentaacetato apresentou-se como cristais incolores com rendimento de 65%.

### 3.5.2. Preparação de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-bromo- $\alpha$ -D-Galp

$\beta$ -D-Galp pentaacetato (7 g ou 0,0179 mol) foi dissolvido em 200 mL de diclorometano seguido de adição de 9 mL de tribrometo de fósforo (0,2701 mol) e, posteriormente, 4 mL de H<sub>2</sub>O (0,2220 mol). A solução de duas fases foi mantida a temperatura ambiente por 4 h sob vigorosa agitação. A fase orgânica foi então separada e neutralizada com carbonato de potássio (100 g) com subsequente filtração através de filtro de Celite. O filtrado foi concentrado com o uso de vácuo para a obtenção do produto desejado na forma de um xarope amarelo pálido (77%)

### 3.5.3. Preparação de Me 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-Galp

2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-bromo- $\alpha$ -D-Galp (0,5 mmol) e I<sub>2</sub> ressublimado (0,5 mmol) foram solubilizados em metanol a 0°C (banho de gelo) em presença de 0,2 g de peneira molecular pulverizada de 4<sup>o</sup>A. A mistura reacional alcançou a temperatura ambiente gradualmente e então foi mantida por 1 hora sob vigorosa agitação. Ao final do tempo de reação, foi adicionada uma solução de bicarbonato de sódio saturada até pH 7-8 seguida de extração com diclorometano (3 x). O extrato orgânico foi então lavado com solução saturada de tiosulfato de sódio até a interrupção da evolução de gás. A fase orgânica foi tratada com sulfato de magnésio e seca a vácuo gerando o produto desejado na forma de um xarope acastanhado com 82% de rendimento (KARTA *et al.*, 1996).

#### 3.5.4. Preparação de Me $\beta$ -D-Galp

À uma solução contendo Me 2,3,4,6-tetra-O- $\beta$ -D-Galp (1 g ou 2,7600 mmol) em 10 ml de metanol foram adicionados 3 ml de uma solução de metóxido de sódio (0,1 M em metanol) sob agitação em temperatura ambiente. Após 40 min., foi adicionada uma pequena porção de água (aprox. 1 mL) gerando uma solução altamente alcalina, a qual foi neutralizada com resina catiônica. Após a remoção da resina através de filtração e evaporação do filtrado, o resíduo resultante foi ressuspense em etanol 95 % a quente (4 mL) e filtrado na presença de carvão ativado. O filtrado foi mantido “overnight” em refrigerador (aprox. 8 °C) sendo o produto coletado na forma de cristais incolores com rendimento de 73% (THOMPSON & WOLFROM, 1963).

#### 3.5.5. Preparação de Me 6-O-*tert*-butildimetilsilil- $\beta$ -D-Galp

Uma solução de cloreto de *tert*-butildimetilsilil (0,6495 g ou 4,3093 mmol) em piridina (15 mL) foi adicionada gota a gota (3 mL/20 min) a uma solução de Me  $\beta$ -D-Galp (0,6495 g ou 3,345 mmol) em 30 mL de piridina. Após a adição, a mistura foi agitada por 12 h a temperatura ambiente e então adicionada a 200 mL de solução de HCl 0,05 M. A mistura resultante foi submetida a extrações sucessivas com clorofórmio (4 x 50 mL) sendo os extratos combinados e evaporados sob vácuo. O resíduo resultante foi purificado através de “dry flash chromatography” com uso de gradiente de solventes a partir de hexano:acetato de etila (3:2) até acetato de etila (83% de rendimento)

#### 3.5.6. Preparação de Me 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp

Me  $\beta$ -D-Galp (0,4669 g ou 2,4044 mmol) e cloreto de tritil (0,7131 g ou 2,5579 mmol) foram solubilizados em 2 mL de piridina e a solução resultante foi mantida sob agitação por 48 h a temperatura ambiente. Após o tempo de reação, 2 mL de água foram adicionados ao meio reacional e mistura resultante foi

extraída 4 vezes com 5 mL de clorofórmio. Os extratos foram combinados, evaporados e resíduo resultante foi purificado através de “dry flash chromatography” com uso de gradiente de solventes a partir de hexano:acetato de etila (5:3) até acetato de etila sendo o produto purificado obtido na forma de sólidos brancos (75% de rendimento).

### 3.5.7. Preparação de Me 6-*O*-tosil- $\beta$ -D-Galp

A uma solução de metil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (0,8864 g ou 4,5648 mmol) em piridina (10 mL) foram adicionadas pequenas porções de uma solução de cloreto de tosil (0,8703 g ou 4,5649 mmol) em piridina (5 ml) durante 3 h em banho de acetonitrila/N<sub>2</sub> (- 42 °C). Após o termino da adição, a mistura reacional foi mantida em freezer (aprox. - 5 °C) por 24 h sob vigorosa agitação. Com o término do tempo de reação, o meio reacional foi diretamente evaporado e o resíduo cromatografado com o uso de acetato de etila. Uma segunda cromatografia ainda foi necessária para a obtenção do produto desejado em alto grau de pureza (50% de rendimento) na forma de sólidos brancos.

### 3.5.8. Método geral para as reações de alquilações regiosseletivas para preparação dos compostos Me 3-*O*-tetradecil- $\beta$ -D-Galp; Me 3,6-di-*O*-tetradecil- $\beta$ -D-Galp; Me 3-*O*-dodecil- $\beta$ -D-Galp; Me 3,6-di-*O*-dodecil- $\beta$ -D-Galp; Me 3-*O*-decil- $\beta$ -D-Galp; Me 3,6-di-*O*-decil- $\beta$ -D-Galp; Me 3-*O*-tetradecil-6-*O*-tritol- $\beta$ -D-Galp.

Os metil galactopiranosídeos (0,5 – 1.0 mmol) e óxido de dibutilestanho (quantidades em acordo com a **Tabela 8** – p. 120) foram refluxados com o uso de aparato Dean Stark por três horas em metanol seguido de refluxo em tolueno (2 h) com remoção azeotrópica da água. Após a evaporação do tolueno, o acetal de dibutilestanileno dos metilgalactopiranosídeos foram utilizados para o próximo passo sem purificação. Solvente anidro (5 – 8 ml), nucleófilo e haleto de alquila

(**Tabela 8**) foram então adicionados à temperatura ambiente. As misturas resultantes foram vigorosamente agitadas sob condições dadas na **Tabela 8**. Após o tempo de reação, o solvente foi removido com o uso de vácuo e o resíduo extraído com acetato de etila seguido de filtração. O filtrado foi então concentrado e purificado através de “dry flash chromatography” com o uso de gradiente de solventes a partir de hexano/acetato de etila (8:1) até acetato de etila. Os compostos apresentados no título deste item foram obtidos em rendimentos de acordo com os apresentados na **Tabela 8**.

### **3.5.9. Método para a reação de sulfatação regioseletiva para preparação do composto Me 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp 6-sulfato, sal sódico.**

Me 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp (0,5224 g ou 1.3380 mmol) e 1,02 eq de óxido de dibutilestanho (0,3400 g ou 1,36476 mmol) foram refluxados em tolueno por 15 h. Após a evaporação do tolueno, foram adicionados tetrahidrofurano (15 mL) e 2,50 eq de Me<sub>3</sub>N.SO<sub>3</sub> (0,4650 g ou 3,3450 mmol) e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 48 h sob atmosfera de gás argônio. Após o tempo de reação, o solvente foi removido com o uso de vácuo e o resíduo ressuspenso em quantidade mínima de metanol (5 mL) sendo o mesmo aplicado em uma coluna de resina catiônica (Dowex 50X2-100, Na<sup>+</sup>, 1,5x7 cm em metanol). O eluato foi concentrado e recromatografado em “dry flash chromatography” (acetato de etila:metanol:água – 24:2:1) produzindo: Me 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp 6-sulfato, sal sódico (96% de rendimento)

## **3.6. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS.**

### **3.6.1. Preparação de $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH e 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH.**

Agarobiitol (0,3167 g ou 0, 9705 mmol), após ser cuidadosamente seco em pistola de pentóxido de fósforo, foi submetido à reação frente a 2,03 equivalentes

de  $\text{Bu}_2\text{SnO}$  (0,4900 g ou 1,9683 mmol) como descrito no item 3.5.8. O meio reacional foi então evaporado sob pressão reduzida, sendo o acetal de dibutilestanileno submetido a reação de alquilação com 5,57 equivalentes de brometo de tetradecila (1,4 mL ou 5,4057 mmol) e 3,00 equivalentes de  $\text{CsF}$  (0,4423 g ou 2,9117 mmol) em DMF (~ 6mL). A reação de alquilação foi mantida por 72 h a 65 °C. Os solventes da mistura reacional foram removidos sob pressão reduzida sendo o resíduo cromatografado em coluna de sílica tendo como fases móveis acetato de etila (eluição do composto dialquilado – 18%), seguido de uma mistura de acetato de etila:metanol:água (12:2:1) para a eluição do composto monoalquilado (38%).

### **3.6.2. Preparação de $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-3,6-An-L-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH}$**

O tetrassacarídeo agarotetraitol (0,1630 g ou 0,2576 mmol) foi submetido à reação frente a 1,25 equivalentes de  $\text{Bu}_2\text{SnO}$  (0,0800 g ou 0,3220 mmol) como descrito no item 3.5.8. O meio reacional foi então evaporado sob pressão reduzida, sendo o acetal de dibutilestanileno submetido à reação de alquilação com 5,57 equivalentes de brometo de tetradecila (0,4 mL ou 1,4348 mmol) e 3,00 equivalentes de  $\text{CsF}$  (0,1500 g ou 0,7728 mmol) em DMF (~ 6mL). A reação de alquilação foi mantida por 72 h a 65°C. Os solventes da mistura reacional foram removidos a pressão reduzida sendo o resíduo cromatografado em coluna de sílica tendo como fase móveis acetato de etila/metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (8:2:1). O tetrassacarídeo monoalquilado foi obtido com um rendimento de 26%.

### **3.6.3. Preparação de 6-O-tritil- $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH}$ .**

Agarobiitol (0,4353 g ou 1,3340 mmol) foi solubilizado em 2 mL de piridina sendo acrescentado cloreto de tritil (0,8182 g ou 2,9349 mmol – cloreto de trifetilmetil) solubilizado em 2 mL piridina, gota a gota, em banho de tetraclorocarbono/ $\text{N}_2$  líquido (~ -20 °C). A mistura resultante foi levada à

temperatura de  $\sim 5^{\circ}\text{C}$  por 24 h e, subsequente, a temperatura ambiente e mantida sob agitação por 48 h. Após o tempo de reação, a mistura reacional foi evaporada e o resíduo resultante foi purificado através de “dry flash chromatography” em acetato de etila sendo o produto purificado obtido na forma de sólidos brancos (39% de rendimento).

#### **3.6.4. Preparação de 3-O-tetradecil-6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH.**

O composto 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH (0,2010 g ou 0,2478 mmol) foi primeiramente submetido à reação frente 1,30 equivalentes de  $\text{Bu}_2\text{SnO}$  (0,0800 g ou 0,3221 mmol) como descrito no item 3.5.8. O meio reacional foi então evaporado sob pressão reduzida, sendo o acetal de dibutilestanileno submetido a reação frente a 4,37 equivalentes de brometo de tetradecila (0,3 mL ou 1,0829 mmol) e 2,66 equivalentes de  $\text{CsF}$  (0,1000 g ou 0,6591 mmol) em DMF ( $\sim 6$  mL). A mistura reacional foi então mantida a  $65^{\circ}\text{C}$  por 72 h seguindo-se de evaporação do meio reacional e cromatografia em sílica (hexano/acetato de etila, 3:1) para a obtenção do produto desejado (23% de rendimento).

#### **3.6.5. Preparação de 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH, sal sódico.**

O composto 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH (0,1511 g ou 0,1863 mmol) foi primeiramente submetido à reação frente 1,08 equivalentes de  $\text{Bu}_2\text{SnO}$  (0,0500 g ou 0,2012 mmol) como descrito no item 3.5.8. O meio reacional foi então evaporado sob pressão reduzida, sendo o acetal de dibutilestanileno submetido a reação frente a 1,92 equivalentes de  $\text{Me}_3\text{N}.\text{SO}_3$  (0,0500 g ou 0,3577) em THF ( $\sim 10$  mL). A mistura reacional foi então mantida a temperatura ambiente por 15 h sob agitação. Após o tempo de reação, o solvente foi removido com o uso de vácuo e o resíduo ressuspenso em quantidade mínima de metanol (5 mL) sendo o mesmo aplicado em uma coluna de resina catiônica (Dowex 50X2-100,



Na<sup>+</sup>, 1.5x7 cm em metanol). O eluato foi concentrado e recromatografado em coluna de sílica com o uso de acetato de etila/metanol/H<sub>2</sub>O (40:2:1) para a obtenção do produto 3-O sulfatado na forma de sal sódico (78% de rendimento).

### **3.6.6. Preparação de 3-O-tetradecil-D-Galp-(1→4)-3,6-An-L-GalOH.**

O composto 3-O-tetradecil-6-O-tritil-β-D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH (0,0193 g ou 0,0191 mmol) foi detritilado através de solubilização em solução de ácido acético 80 % em água (3 mL) sendo a mistura mantida por 1,5 h a 40 °C. Após o tempo de reação, o meio reacional foi evaporado sob pressão reduzida sendo o resíduo cromatografado em coluna de sílica com o uso de acetato de etila/metanol/H<sub>2</sub>O (16:2:1). O composto detritilado foi obtido com rendimento de 81% após purificação.

### **3.6.7. Preparação de β-D-Galp 3-sulfato-(1→4)-3,6-An-L-GalOH, sal sódico.**

O composto 6-O-tritil-β-D-Galp 3-sulfato-(1→4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH, sal sódico (0,0212 g ou 0,0231 mmol) foi detritilado como descrito no item 3.6.6. Após o tempo de reação, o meio reacional foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo ressuspenso em quantidade mínima (1 mL) de metanol/H<sub>2</sub>O (3:1), sendo o mesmo aplicado em uma coluna de resina catiônica (Dowex 50X2-100, Na<sup>+</sup>, 1.5x7 cm em metanol/H<sub>2</sub>O – 3:1). O eluato foi concentrado e recromatografado em coluna de sílica com o uso de acetato de etila/metanol/H<sub>2</sub>O (6:3:1). O composto detritilado foi obtido na forma de sal sódico com rendimento de 69% após purificação.

### **3.6.8. Preparação de β-D-Galp 3-sulfato-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH, sal sódico.**

O composto β-D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH (0,0800 g ou 0,1530 mmol) foi primeiramente submetido à reação frente 1,10 equivalentes de

Bu<sub>2</sub>SnO (0,0419 g ou 0,1683 mmol) como descrito no item 3.5.8. O meio reacional foi então evaporado sob pressão reduzida, sendo o acetal de dibutilestanileno submetido à reação frente a 1,64 equivalentes de Me<sub>3</sub>N.SO<sub>3</sub> (0,0350 g ou 0,2509 mmol) em THF (~ 5 mL). A mistura reacional foi então mantida a temperatura ambiente por 15 h sob agitação. Após o tempo de reação, o solvente foi removido com o uso de vácuo e o resíduo ressuspenso em quantidade mínima de metanol (2 mL) sendo o mesmo aplicado em uma coluna de resina catiônica (Dowex 50X2-100, Na<sup>+</sup>, 1.5x7 cm em metanol). O eluato foi concentrado e recromatografado em coluna de sílica com o uso de acetato de etila/metanol/H<sub>2</sub>O (12:2:1) para a obtenção do produto 3-O sulfatado na forma de sal sódico (70% de rendimento).

### **3.6.9. Sulfatação de 3-O-tetradecil-β-D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH.**

O composto 3-O-tetradecil-β-D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH (0,0618 g ou 0,0859 mmol) foi primeiramente submetido à reação frente 1,10 equivalentes de Bu<sub>2</sub>SnO (0,0235 g ou 0,0945 mmol) como descrito no item 3.5.8. O meio reacional foi então evaporado sob pressão reduzida, sendo o acetal de dibutilestanileno submetido à reação frente a 1,20 equivalentes de Me<sub>3</sub>N.SO<sub>3</sub> (0,0144 g ou 0,1031 mmol) em THF (~ 5 mL). A mistura reacional foi então mantida a temperatura ambiente por 15 h sob agitação. Após o tempo de reação, o solvente foi removido com o uso de vácuo e o resíduo ressuspenso em quantidade mínima de metanol (2 mL) sendo o mesmo aplicado em uma coluna de resina catiônica (Dowex 50X2-100, Na<sup>+</sup>, 1.5x7 cm em metanol). O eluato foi concentrado e recromatografado em coluna de sílica com o uso de acetato de etila/metanol/H<sub>2</sub>O (24:2:1) para a obtenção de uma mistura de dois isômeros dialquilados monossulfatos que não puderam ser separados.

### 3.6.10. Preparação de $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-D-GalOH, sal sódico.

O oligossacarídeo naturalmente sulfatado,  $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-D-GalOH (0,1267 g ou 0,2957 mmol), após ser cuidadosamente seco em pistola de pentóxido de fósforo, foi submetido à reação frente a 1,85 equivalentes de Bu<sub>2</sub>SnO (0,1366 g ou 0,5470 mmol) como descrito no item 3.5.8. O meio reacional foi então evaporado sob pressão reduzida, sendo o acetal de dibutilestanileno submetido a reação de alquilação com 9,74 equivalentes de brometo de tetradecila (0,8 ml ou 2,8801 mmol) e 3,83 equivalentes de CsF (0,1726 g ou 1,1325 mmol) em DMF (~ 6 mL). A reação de alquilação foi mantida por 72 h a 65 °C. Os solventes da mistura reacional foram removidos a pressão reduzida sendo o resíduo cromatografado em coluna de sílica tendo como fase móvel uma mistura de acetato de etila:metanol:água (12:2:1) para a eluição do composto monossulfatado e monoalquilado (36%).

## 3.6. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

### 3.6.1. Aspectos gerais e técnicas de ressonância magnética nuclear monodimensionais.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em dois espectrômetros:

- BRUKER Avance DRX 400 operando na frequência base de 400,13 MHz e 100,63 MHz para os núcleos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente.
- BRUKER Avance-500 operando a 500,13 MHz; 125,77 MHz e 186,47 MHz para os núcleos de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e <sup>119</sup>Sn, respectivamente.

Os assinalamentos e as magnitudes das constantes de acoplamento foram obtidos a partir dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H através de análises de primeira ordem. A aparência dos sinais é indicada pelas abreviaturas **b**, **s**, **d**, **t**, **q**, **p**, e **m** para “broad”, singlete, duplete, triplete, quarteto, penteto e multiplete,

Os espectros de RMN –  $^{13}\text{C}$  DEPT foram obtidos em um  $\theta_z$  de  $135^\circ$ , onde CH e  $\text{CH}_3$  ocorrem em fase positiva em relação à linha de base e  $\text{CH}_2$  em fase negativa. É importante mencionar que nos experimentos de DEPT os sinais dos carbonos quaternários (não ligados diretamente ao H) não aparecem.

As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CDCl}_3$  entre outros) e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise a temperaturas entre  $25^\circ\text{C}$  e  $50^\circ\text{C}$ . As amostras para RMN de  $^{119}\text{Sn}$  foram preparadas em condições anidras, em linha de vácuo através de destilação dos solventes deuterados, sendo os tubos selados como previamente descrito (GRINDLEY *et al.*, 1992b).

Os deslocamentos químicos expressos em ppm, foram determinados utilizando-se:

- padrões internos:  $\text{Me}_4\text{Si}$  (0,00 ppm para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) ou acetona (2,23 ppm e 30,2 ppm,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente)
- sinal central dos solventes deuterados:  $\text{CDCl}_3$  (7,27 ppm e 77,23 ppm,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente); acetona- $d_6$  (2,05 ppm e 29.92 ppm,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente);  $\text{CD}_3\text{OD}$  (3,31 ppm e 49,1 ppm,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente).
- padrão externo de tetrametilestanho (0,0 ppm) para os espectros de RMN de  $^{119}\text{Sn}$

### 3.6.2 Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear Bidimensionais

#### 3.6.2.1. COSY (*Correlation Spectroscopy*)

Esta técnica homonuclear foi utilizada para correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de  $^1\text{H}$  vicinais acoplados. Assim, o H-1 de um monossacarídeo apresenta acoplamento com o H-2 da mesma unidade, sendo possível observar esta interação na forma de um pico cruzado (“cross peak”) entre os mesmos sinais, quantificar esta interação através da determinação da constante de acoplamento ( $J$ ) e ainda determinar o deslocamento químico do H-2 a partir do H-1. Desta forma a partir do sinal de H-2, pode-se determinar o H-3 e

assim sucessivamente ao longo do anel, salvo algumas particularidades apresentadas pelas diferentes unidades monossacarídicas. Como cada unidade monossacarídica apresenta um padrão de constantes de acoplamento característico, com estes resultados é possível determinar o tipo de açúcar presente na estrutura.

#### **3.6.2.2. TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*)**

Nesta técnica, também homonuclear, os picos cruzados (“cross peaks”) são gerados não só pelos prótons vicinais e sim por todos os núcleos do sistema de spin acoplado (no caso de unidades glucosil), desta forma temos os picos cruzados correspondentes a interação do H-1 com H-2, assim como, do H-1 - H-3, H-1 - H-4 e assim sucessivamente. Entretanto, a correlação total é observada mais facilmente em resíduos de glucose enquanto, por exemplo, na galactose existem algumas correlações que não são passíveis de observação.

#### **3.6.2.3. HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy*)**

Esta técnica heteronuclear, permite determinar quais átomos de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) estão ligados a quais átomos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) a partir de sinais de  $^{13}\text{C}$  conhecidos ou de  $^1\text{H}$  já determinados por COSY e TOCSY.

#### **3.6.2.4. HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*)**

Técnica heteronuclear que fornece basicamente a mesma informação que o HMQC, ou seja, correlações entre os núcleos de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . Entretanto, o experimento de HSQC não é afetado pelos acoplamentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , gerando espectros com melhor resolução. A desvantagem em relação ao HMQC seria a maior complexidade da sequência de pulso do HSQC, levando a uma maior suscetibilidade para a perda de sinal devido a maior probabilidade de erros nos intervalos dos pulsos.

### 3.6.2.5. HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy*)

Nesta técnica heteronuclear são observadas correlações correspondentes a átomos de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e átomos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) que estão duas ou três ligações distantes ( $^2J$  e  $^3J$ ). Estas informações são particularmente úteis em compostos que apresentam carboxilas, carbonilas cetônicas e átomos de carbono quaternário, ou átomos de carbono sem hidrogênio ligado.

### 3.7. IONIZAÇÃO POR SPRAY DE ELÉTRONS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (ESIMS)

Os experimentos de ESIMS foram realizados no espectrômetro MICROMASS QUATTRO LC-MS/MS de triplo quadrupolo. A aquisição e processamento de dados são feitos utilizando o programa MASLYNX 3.2.

Para realização das análises as amostras foram diluídas (1 mg/mL) em acetonitrila/água (7:3) e introduzidas no espectrômetro através de uma seringa acoplada a bomba (KD Scientific Inc.).  $\text{N}_2$  foi usado como gás de nebulização (83 L/h) e desolvatação (309 L/h). A fonte é operada a  $150^\circ\text{C}$  e a temperatura de desolvatação é mantida a  $250^\circ\text{C}$ .

Para a determinação dos íons pais no modo positivo, os parâmetros foram: 5,0 kV (capilar) e 50 V (cone). Para o modo negativo o capilar e o cone foram ajustados a 4,0 kV e 100 V respectivamente. Em ambos os modos, a pressão foi mantida a  $1,1 \times 10^{-5}$  mBar para o analisador e  $2,0 \times 10^{-5}$  mBar para célula de gás.

Os íons filhos foram estudados através dissociação induzida por colisão (CID – “collision induced dissociation”). Para esta análise, as voltagens do capilar e do cone estão sendo ajustadas a 3.0 kV e 60 V respectivamente. Como gás de colisão, foi usado gás argônio 99,9% com energia de colisão de 50 eV. As pressões do analisador e célula de gás são mantidas a  $3,4 \times 10^{-5}$  e  $9,7 \times 10^{-4}$  mBar respectivamente.

### 3.8. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIVIRAL

Os ensaios de atividade antiviral foram realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina.

Soluções de diferentes concentrações de oligossacarídeos alditóis quimicamente modificados foram testados frente a três cepas de vírus causador do herpes simples: HSV-1 (F); HSV-2 (G); HSV-2 (MS). Foram determinadas as CI50 (concentração inibitória 50%), comparando as culturas tratadas com as não tratadas (DUARTE *et al.*, 2001a).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos solúveis em água provenientes das algas vermelhas *Kappaphycus alvarezii*, *Gigartina skottsbergii* e *Acanthophora spicifera* foram submetidos a tratamento alcalino (NOSEDA & CERESO, 1995) para completa ciclização das unidades de  $\alpha$ -D-galactopirranose sulfatadas em C-6 (**Figura 29**). As carragenanas encontradas nas algas vermelhas *K. alvarezii* e *G. skottsbergii* já foram extensivamente estudadas quanto às suas estruturas primárias e padrão de sulfatação. *K. alvarezii* produz *kappa*-carragenana [ $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3,6-An-D-Galp] (ZABACKIS *et al.*, 1991; KNUTSEN *et al.*, 1994; ESTEVES *et al.*, 2000; ESTEVES *et al.*, 2004) enquanto *G. skottsbergii* biossintetiza *lambda*-carragenana [ $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp 2,6-dissulfato] em sua fase tetrasporofítica (MATULEWICZ *et al.*, 1990). Através do tratamento alcalino, a *lambda*-carragenana foi transformada em *theta*-carragenana pela dessulfatação seletiva do C-6 dos resíduos de  $\alpha$ -D-Galp 2,6-dissulfato, originando unidades de 3,6-An- $\alpha$ -D-Galp 2-sulfato.

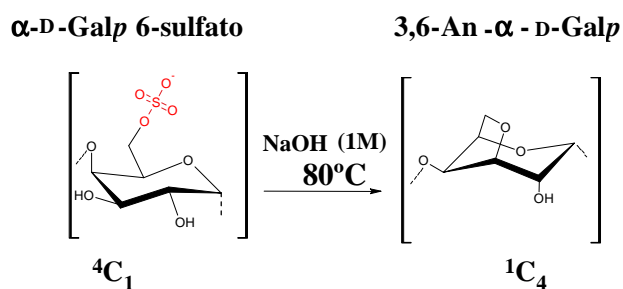
Os polissacarídeos solúveis em água extraídos de *A. spicifera* têm sido amplamente estudados quanto sua estrutura (CAUDURO, 2000; NOSEDA *et al.*, 2000; GONÇALVES, 2001). Após tratamento alcalino, esta galactana apresenta-se como uma agarana [ $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3,6-An-L-Galp] com grupos sulfato presentes principalmente no C-2 da unidade **A** e presença minoritária de acetal de ácido pirúvico em C-4 e C-6.

GUIMARÃES (2002) demonstrou que polissacarídeos extraídos da alga vermelha *G. domingensis* correspondem principalmente a agarose 6-sulfato, sendo a mesma constituída por unidades dissacarídicas repetitivas de [ $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp 6-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3,6-An-L-Galp].

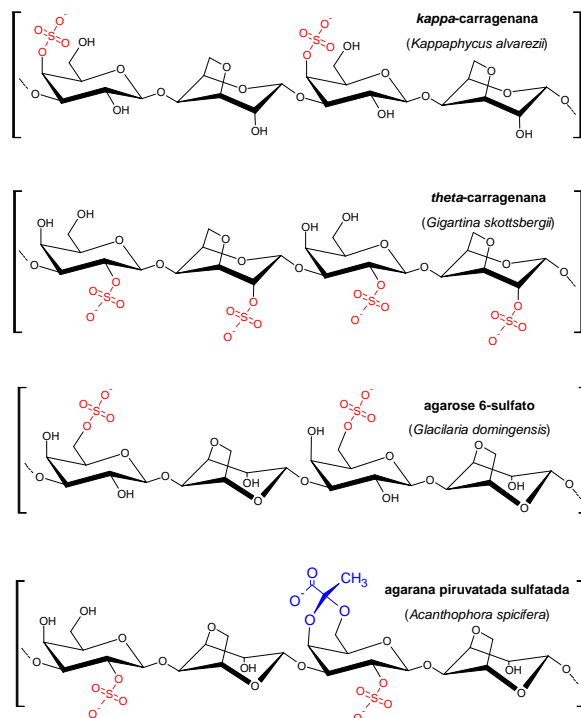


Deste modo, a partir destas algas, foram obtidos os polissacarídeos-modelo do tipo *kappa*, *theta*, agarose 6-sulfato e uma agarana piruvatada e sulfatada (**Figura 30**).

**Figura 29:** Reação de ciclização em carragenanas.



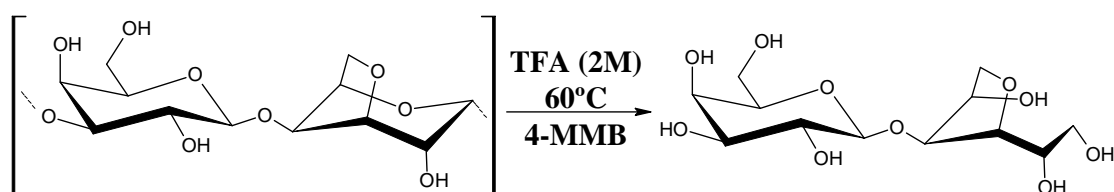
**Figura 30:** Estruturas da *kappa*- e *theta*-carragenanas, agarose 6-sulfato e agarana piruvatada e sulfatada.



## 4.2. OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL (HRP):

Os polissacarídeos obtidos foram submetidos a HRP de acordo com o método de USOV e ELASHVILI (1991). Este tipo de hidrólise parcial favorece a quebra das ligações 3,6-anidrogalactosídicas, preservando as demais ligações glicosídicas da molécula, com concomitante redução dos terminais gerados durante a hidrólise (**Figura 31**).

**Figura 31:** Hidrólise redutiva parcial em carragenanas.

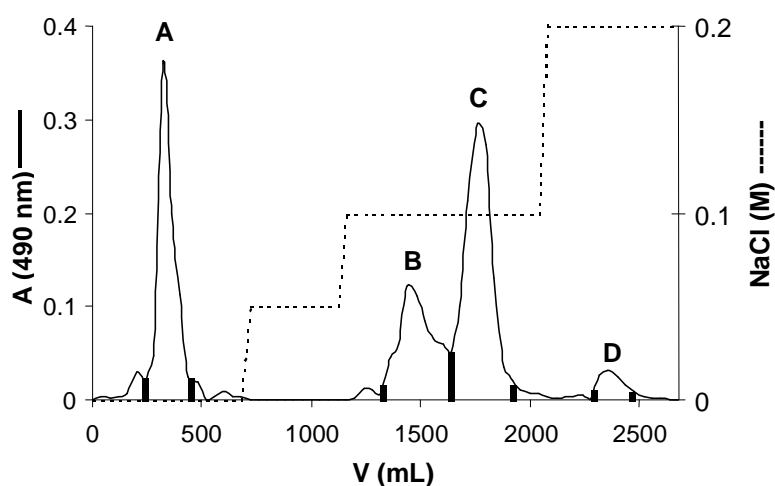


Considerando a natureza repetitiva das galactanas estudadas e a especificidade da hidrólise redutiva parcial, através da aplicação deste método hidrolítico, deveriam ser produzidos somente dissacarídeos alditóis com grupos sulfato em acordo com os polissacarídeos que o originaram. Tendo em vista este objetivo, as galactanas obtidas na etapa anterior foram submetidas à hidrólise redutiva parcial.

#### 4.2.1. Oligossacarídeos provenientes da agarana piruvilada e sulfatada (*Acanthophora spicifera*).

Os dissacarídeos alditóis  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarobiitol); 4,6-(1-carboxietilideno)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol);  $\beta$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato) e 4,6-(1-carboxietilideno)- $\beta$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato) foram obtidos como descrito anteriormente (GONÇALVES, 2001): O extrato bruto a quente da alga *A. spicifera*, após tratamento alcalino, foi submetido à hidrólise redutiva parcial. O hidrolisado foi então purificado através de passos seqüenciais de cromatografias de adsorção em carvão-Celite, troca aniônica em gradiente descontínuo de NaCl (**Figura 32**) utilizando DEAE Sephadex A-25 (Cl<sup>-</sup>), e filtração em gel em BioGel P-2.

**Figura 32:** Perfil de eluição da cromatografia de troca aniônica em DEAE Sephadex A-25 (Cl<sup>-</sup>). Hidrolisado da agarana de *Acanthophora spicifera*: (A) agarobiitol; (B) 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol; (C) agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato; (D) 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato.



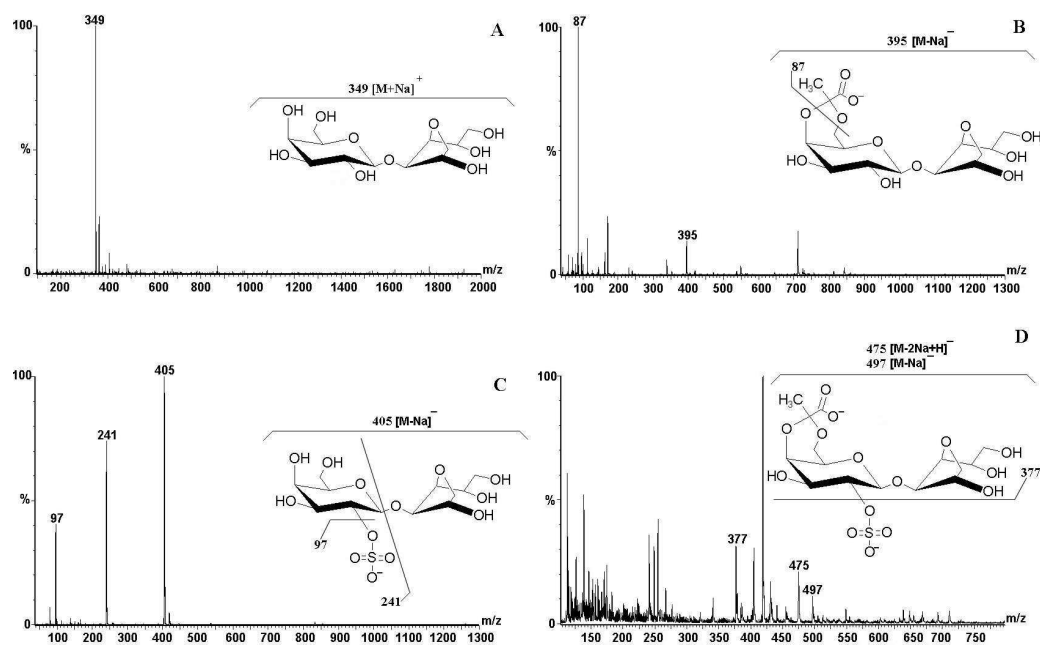
**Tabela 2:** Assinalamentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  dos dissacarídeos alditóis (**A**) agarobiitol; (**B**) 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol; (**C**) agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato; (**D**) 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato.

Unidade	$^{13}\text{C}$ ou $^1\text{H}$	A		B		C		D	
		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
$\beta$ -D-Galp	1	4,56	102,2	4,58	102,0	4,72	100,5	4,70	100,0
	2	3,51	70,6	3,64	70,2	4,25	78,8	4,26	78,7
	3	3,65	72,5	3,72	71,6	3,86	71,9	3,90	71,1
	4	3,94	68,5	4,17	70,8	4,00	68,6	4,23	70,4
	5	3,70	75,2	3,62	66,2	3,73	75,1	3,58	66,3
	6	3,76	60,9	4,06	64,8	3,79	60,8	4,02	64,9
	6'	3,76	–	3,94	–	3,79	–	3,91	–
Acetal de ácido pirúvico	CH <sub>3</sub>	–	–	1,46	25,0	–	–	1,47	25,1
	COO <sup>-</sup>	–	–	–	175,9	–	–	–	175,9
3,6-An-L-GalOH	1	3,65	62,7	3,71	62,9	3,67	62,9	3,71	63,0
	1'	3,65	–	3,71	–	3,67	–	3,71	–
	2	3,93	70,9	3,96	71,0	3,93	71,0	4,23	70,9
	3	3,91	83,5	3,96	83,5	3,93	83,5	3,96	83,6
	4	4,33	85,4	4,31	85,6	4,30	86,2	4,32	85,8
	5	4,40	75,2	4,40	75,2	4,44	75,2	4,43	75,2
	6	3,97	72,9	4,01	72,9	4,01	73,0	4,06	73,1
	6'	3,87	–	3,87	–	3,86	–	3,92	–

Após purificação, os oligossacarídeos foram completamente caracterizados por técnicas de RMN (**Tabela 2**), incluindo os experimentos monodimensionais  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT, e bidimensionais  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY and  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMQC (GONÇALVES, 2001).

Os quatro dissacarídeos alditóis caracterizados pelos experimentos de RMN foram então submetidos à análise por ESIMS (**Figura 33, Tabela 3**). O agarobiitol (**A**) foi primeiramente analisado no modo positivo gerando um espectro que apresentava um íon com  $m/z$  349  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , correspondendo ao dissacarídeo alditol neutro na forma  $\text{Na}^+$ . No modo negativo, o espectro apresentou o íon com  $m/z$  325  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , formado a partir da desprotonação da mesma molécula. Para o 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol (**B**), a análise no modo positivo gerou o íon com  $m/z$  441, o qual corresponde ao sal sódico na forma  $\text{Na}^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  do dissacarídeo alditol piruvilado. Na análise em modo negativo, além do íon com  $m/z$  395  $[\text{M}-\text{Na}]^-$ , foi possível observar um intenso íon originado a partir da quebra do grupo pirúvico com  $m/z$  87. Na análise do agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato (**C**) em modo positivo foi observado um íon de  $m/z$  451 correspondente ao sal sódico do dissacarídeo alditol monossulfatado na forma  $\text{Na}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Já no modo negativo o espectro apresentou o íon molecular  $m/z$  405  $[\text{M}-\text{Na}]^-$ , acompanhado dos íons filhos correspondentes ao  $\text{HSO}_4^-$  ( $m/z$  97) e a hexopiranosose sulfato ( $m/z$  241). A análise do dissacarídeo alditol simultaneamente piruvilado e sulfatado 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato (**D**) forneceu o íon  $m/z$  543 no modo positivo correspondendo ao sal dissódico na forma  $\text{Na}^+$ . Repetindo-se a análise no modo negativo, foi visualizado os íons  $m/z$  497 e 475 atribuídos as formas  $[\text{M}-\text{Na}]^-$  e  $[\text{M}-2\text{Na}+\text{H}]^-$ , respectivamente. Também foi detectado o íon  $m/z$  377, o qual corresponde ao mesmo dissacarídeo alditol com a perda de um grupo sulfato  $[\text{M}-2\text{Na}-\text{H}-\text{SO}_4]^-$ .

**Figura 33:** Espectros de ESIMS do agarobiitol (modo positivo); 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol (modo negativo); agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato (modo negativo); 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato (modo negativo).

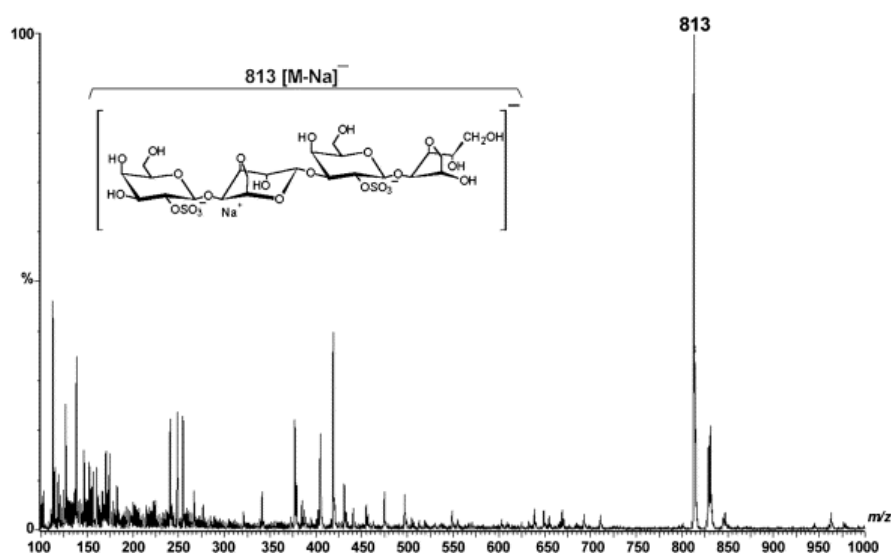


**Tabela 3 :** Íons moleculares observados nos espectros observados da figura 33.

Modo	Íon	$m/z$			
		A	B	C	D
Positivo	$[M+Na]^+$	349	—	—	—
	$[M+2Na]^+$	—	441	451	—
	$[M+3Na]^+$	—	—	—	543
Negativo	$[M-H]^-$	325	—	—	—
	$[M]^-$	—	395	405	—
	$[M+H]^-$	—	—	—	475
	$[M+Na]^-$	—	—	—	497

Ainda, foi realizada a HRP de uma fração purificada por precipitação com KCl e processada por tratamento alcalino, proveniente do primeiro extrato aquoso a quente da alga *A. spicifera*. O hidrolisado foi então submetido aos mesmos passos cromatográficos seqüenciais anteriormente utilizados (GONÇALVES, 2001). Da mesma forma que para a hidrólise do polissacarídeo não purificado, foram encontrados os oligossacarídeos agarobiitol, agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato e 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol nas frações eluídas em água e 0,1 M de NaCl. Entretanto, a fração eluída em 0,2 M de NaCl apresentou-se composta por um tetrassacarídeo dissulfatado, ao invés de um dissacarídeo piruvilado e sulfatado, segundo os dados de ESIMS (**Figura 34**). De acordo com a estrutura apresentada por esta fração polissacarídica, este oligossacarídeo alditol corresponderia ao  $\beta$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarotetraitol 2<sup>2</sup>,2<sup>4</sup>-dissulfato). Devido à quantidade reduzida desta amostra, bem como a presença de algumas impurezas, não foi possível a obtenção do completo assinalamento de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H. Alguns assinalamentos obtidos no espectro de HMQC, indicaram a estrutura proposta como verdadeira.

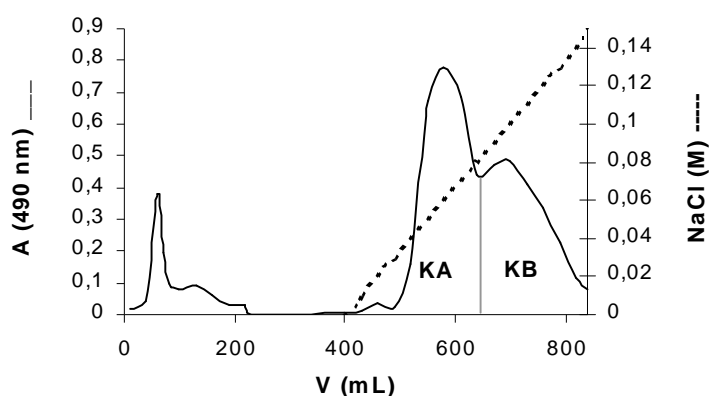
**Figura 34:** Espectro de ESIMS do agarotetraitol 2<sup>2</sup>,2<sup>4</sup>-dissulfato



#### 4.2.2. Oligossacarídeos provenientes de *kappa*-carragenana (*Kappaphycus alvarezii*).

O hidrolisado parcial de *kappa*-carragenana foi diretamente submetido à cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25 ( $\text{Cl}^-$ ), eluindo-se primeiramente com água e subsequente com gradiente contínuo de NaCl (**Figura 35**). Com este procedimento, foram obtidas uma fração referente a eluição com água e duas frações (KA e KB) com o gradiente contínuo.

**Figura 35:** Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25 ( $\text{Cl}^-$ ) do produto de HRP de *kappa*-carragenana.



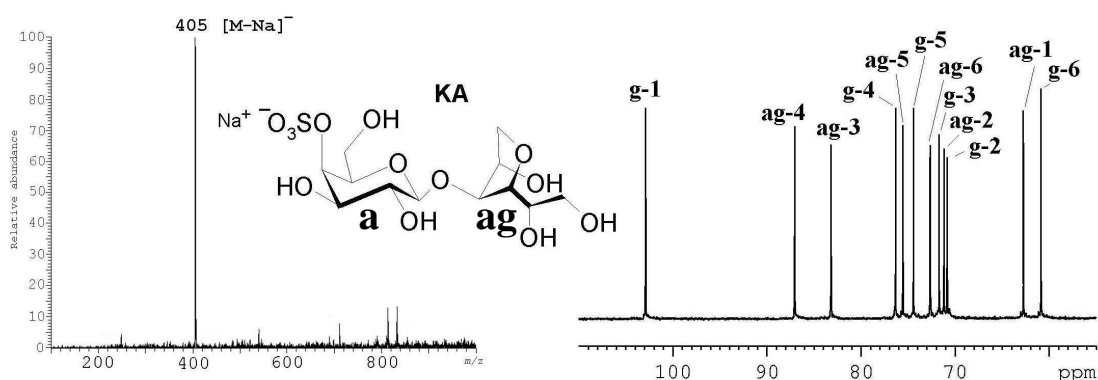
As frações obtidas foram então submetidas à cromatografia de filtração em gel (BioGel P-2) para a eliminação dos sais e subprodutos de hidrólise. A fração aquosa apresentou-se composta majoritariamente por metilmorfolina (subproduto do 4-MMB), não apresentando quantidades detectáveis de oligossacarídeos pelas análises preliminares de RMN. As frações obtidas no gradiente contínuo de NaCl apresentaram-se constituídas por oligossacarídeos, sendo estes submetidos à análise estrutural.

A fração KA apresentou um espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  compatível com a presença de um dissacarídeo alditol (USOV & ELASHVILI, 1991; USOV & ELASHVILI, 1997), sendo este completamente assinalado ( $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ ) com auxílio



dos experimentos de RMN bidimensionais (**Tabela 4**). O sinal em 4,67 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e o seu sinal correspondente no experimento de RMN de  $^{13}\text{C}$  (76,3 ppm) foram determinados como H-4 e C-4 da unidade de  $\beta$ -D-Galp. Estes valores estão em acordo com a presença de um grupo sulfato em C-4, como esperado, de acordo com estrutura do polissacarídeo precursor. A análise de ESIMS, nos modos negativos e positivos, mostraram os íons  $m/z$  405  $[\text{M}-\text{Na}]^-$  e 451  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , respectivamente, correspondendo aos resultados esperados para um dissacarídeo alditol monossulfatado ( $M_n$  428, sal sódico). Estes dados indicaram que KA correspondia a  $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-D-GalOH (carrabiitol 4 $^2$ -sulfato – **Figura 36**).

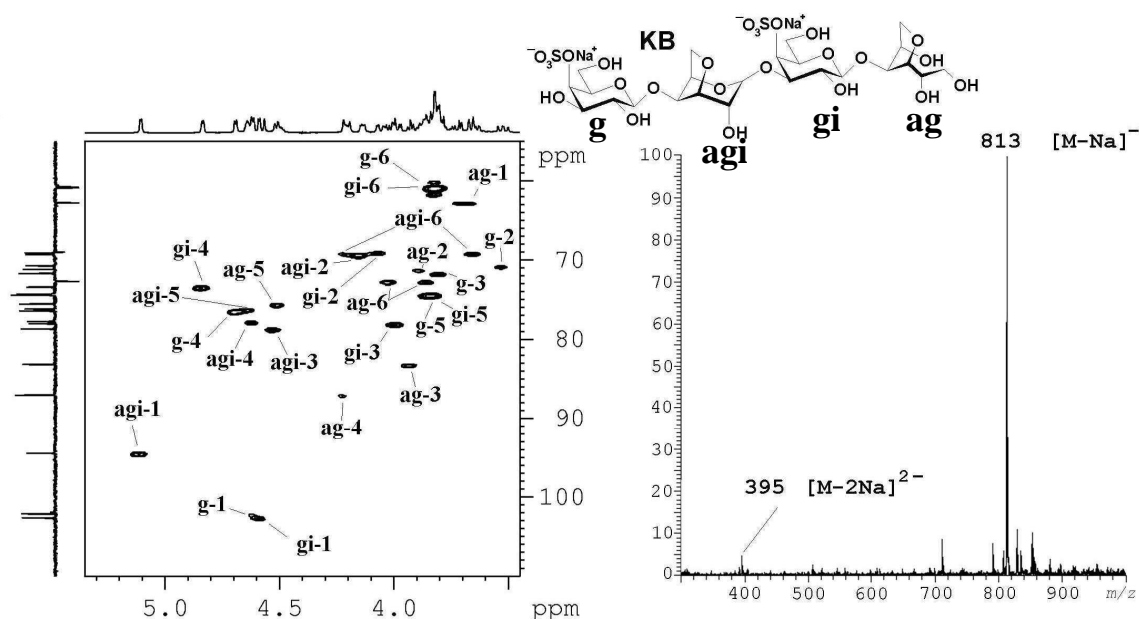
**Figura 36:** Espectros de ESIMS em modo negativo e RMN de  $^{13}\text{C}$  do carrabiitol 4 $^2$ -sulfato (KA). No espectro de RMN, **g** e **ag** correspondem a Galp e 3,6-AnGalOH, respectivamente.



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração KB apresentou três sinais na região anomérica correspondendo ao C-1 de unidades de  $\beta$ -D-Galp terminal (102,2 ppm) e interna (102,7 ppm), e unidade de 3,6-An- $\alpha$ -D-Galp (94,5 ppm). Estes dados, combinados com a presença de um sinal em 62,8 ppm (C-1 da unidade de 3,6-An-D-GalOH) indicaram que KB correspondia a um tetrassacarídeo alditol. Com o seu assinalamento completo de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (**Tabela-4**), foi possível confirmar as

sulfatações esperadas em C-4 para ambas unidades de  $\beta$ -D-Galp terminal (76,4 ppm) e interna (73,4 ppm). A estrutura proposta para KB,  $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-D-GalOH (carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato), apresenta-se em acordo com os íons  $m/z$  813  $[M-Na]^-$  e 395  $[M-2Na]^{2-}$  (modo negativo) e  $m/z$  859  $[M+Na]^+$  (modo positivo) na análise de ESIMS. Estes resultados de espectrometria de massa são compatíveis com a massa média esperada para um tetrassacarídeo alditol dissulfatado (Mn 836, sal dissódico – **Figura 37**).

**Figura 37:** Espectro de ESIMS em modo negativo e espectro de HMQC do carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato (KB). No espectro de HMQC, **g**, **agi**, **gi**, e **ag** correspondem a Galp externa, 3,6-AnGalp, Galp interna, e 3,6-AnGalOH, respectivamente.



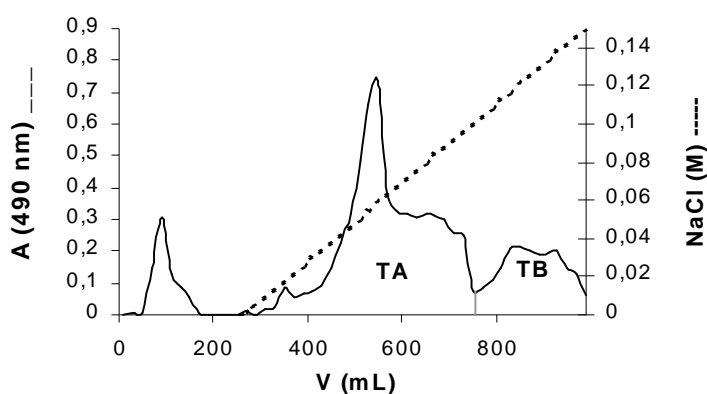
**Tabela 4:** Rendimentos, assinalamentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , e íons identificados na análise de ESIMS dos oligossacarídeos derivados da *kappa*-carragenana carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato (KA) e carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato (KB).

Oligossacarídeo			KA		KB	
Rendimento			9.5%		6.8%	
			<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
Assinalamentos de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C	Galp	1	4,51	103,0	4,61	102,2
	(ext.)	2	3,53	70,8	3,52	70,7
		3	3,80	71,7	3,80	71,7
		4	4,67	76,3	4,70	76,4
		5	3,82	74,4	3,83	74,4
		6	3,80	60,7	3,81	60,8
		6'	3,80		3,81	
	3,6-An-Galp	1			5,11	94,5
		2			4,15	69,3
		3			4,52	78,7
		4			4,62	77,8
		5			4,64	76,2
		6			4,21	69,1
		6'			3,95	
	Galp (int.)	1			4,58	102,7
		2			4,06	69,0
		3			3,99	78,1
		4			4,84	73,4
		5			3,83	74,4
		6			3,81	60,8
		6'			3,81	
	3,6-An-GalOH	1	3,67	62,7	3,69	62,8
		1'	3,67		3,69	
		2	3,82	71,2	3,89	71,2
		3	3,98	83,2	3,93	83,2
		4	4,16	87,0	4,22	87,01
		5	4,47	75,5	4,50	75,6
		6	3,98	72,6	4,09	72,7
		6'	3,82		3,93	
Íons - ESIMS			m/z		m/z	
	Modo positivo		451 [M+Na] <sup>+</sup>		859 [M+Na] <sup>+</sup>	
	Modo negativo		405 [M-Na] <sup>-</sup>		813 [M-Na] <sup>-</sup>	
					395 [M-2Na] <sup>2-</sup>	

#### 4.2.3. Oligossacarídeos provenientes de *theta*-carragenana (*Gigartina skottsbergii*).

Seguindo o mesmo procedimento realizado para a obtenção dos oligossacarídeos a partir da *kappa*-carragenana, a *theta*-carragenana foi submetida à hidrólise reductiva parcial, segundo USOV e ELASHVILI (1991). Entretanto, a análise de RMN de  $^{13}\text{C}$  do hidrolisado indicou que o tempo padrão para este tipo de hidrólise (8 h) não foi suficiente para a geração de oligossacarídeos. Deste modo, o tempo de hidrólise foi prolongado para 12 h. O hidrolisado foi então submetido à cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25 ( $\text{Cl}^-$ ), gerando duas frações oligossacarídicas principais, TA e TB (Figura 38).

**Figura 38:** Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25 ( $\text{Cl}^-$ ) do produto de HRP de *theta*-carragenana.

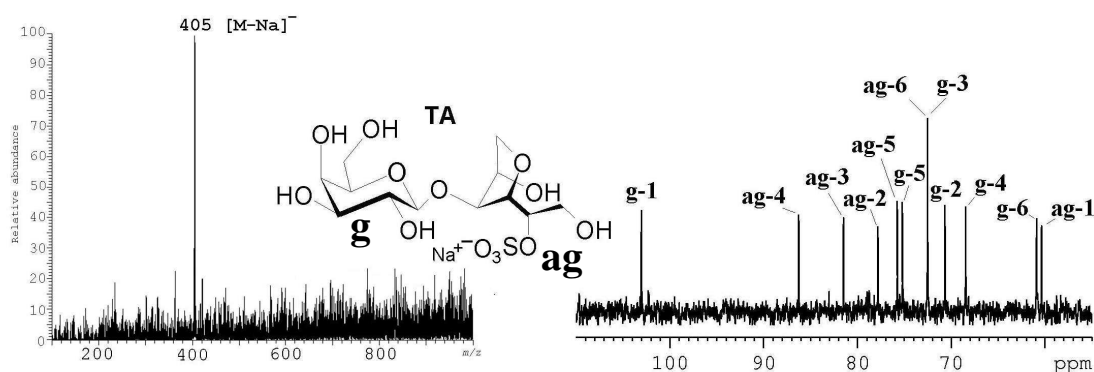


As frações obtidas a partir da cromatografia de troca iônica (TA e TB) foram submetidas à cromatografia em BioGel P-2 para a eliminação dos sais e subprodutos de hidrólise. Os oligossacarídeos puros foram então analisados pelas técnicas de ESIMS e RMN (Tabela 5).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração TA apresentou doze sinais, indicando a presença de um dissacarídeo alditol. O sinal correspondente ao C-2 da unidade

galactitol apresentava-se 6,7 ppm deslocado para campo de baixa frequência quando comparado com o assinalamento para a unidade de 3,6-An-L-GalOH (USOV & ELASHVILI, 1991; USOV & ELASHVILI, 1997), confirmando a presença do grupo sulfato nesta posição. O sinal atribuído ao C-2 da unidade de  $\beta$ -D-Galp foi identificado em 70,7 ppm, indicando um carbono não substituído. Entretanto, conhecendo-se a estrutura da *theta*-carragenana, a sulfatação desta posição também era esperada. Este dado sugeriu uma hidrólise específica do C-2 das unidades de  $\beta$ -D-Galp durante o processo hidrolítico. As análises de ESIMS para TA mostraram resultados idênticos aqueles obtidos para KA, confirmando a presença de somente um grupo sulfato ligado ao dissacarídeo alditol. Estes resultados demonstraram que TA consistia em  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-D-GalOH 2-sulfato (carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato – **Figura 39**).

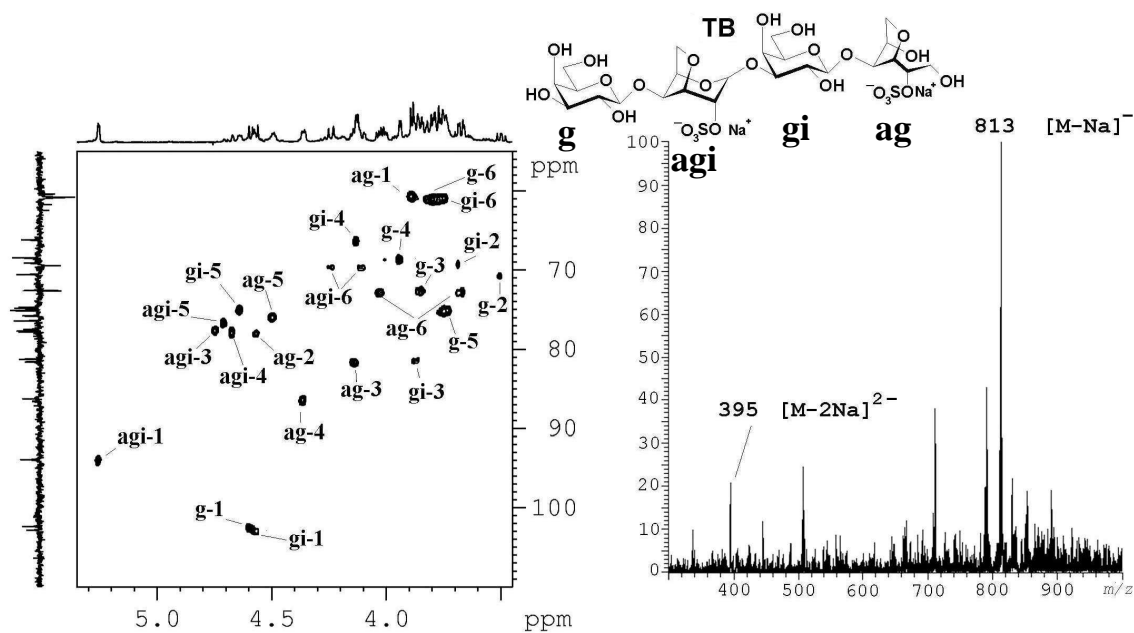
**Figura 39:** Espectros de ESIMS em modo negativo e RMN de <sup>13</sup>C do carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato (TA). No espectro de RMN, **g** e **ag** correspondem a Galp e 3,6-AnGalOH, respectivamente.



A fração TB apresentou dados de RMN compatíveis com os de um tetrassacarídeo alditol. Com o completo assinalamento de RMN desta fração (**Tabela 5**), foi possível observar que o C-2 de ambas as unidades de  $\beta$ -D-Galp, terminal (70,6 ppm) e interna (69,1 ppm), apresentavam-se não substituídos. A presença do grupo sulfato em C-2 da unidade de 3,6-An-D-GalOH foi confirmado pelo sinal em 77,8 ppm. O sinal correspondente ao C-2 sulfatado da unidade de

3,6-An- $\alpha$ -D-Galp (74,8 ppm) apresentava-se menos deslocado em função do efeito- $\beta$  causado pela ligação glicosídica. As análises de ESIMS mostraram íons  $m/z$  813  $[M-Na]^-$  e 395  $[M-2Na]^{2-}$  (modo negativo) e  $m/z$  859  $[M+Na]^+$  (modo positivo). Estes resultados indicaram que TB correspondia a um tetrassacarídeo alditol parcialmente dessulfatado, especificamente,  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An- $\alpha$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-D-GalOH 2-sulfato (carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato,  $M_n$  836, sal dissódico – **Figura 40**).

**Figura 40:** Espectro de ESIMS em modo negativo e espectro de HSQC do carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato (KB). No espectro de HSQC, **g**, **agi**, **gi**, e **ag** correspondem a Galp externa, 3,6-AnGalp, Galp interna, e 3,6-AnGalOH, respectivamente.



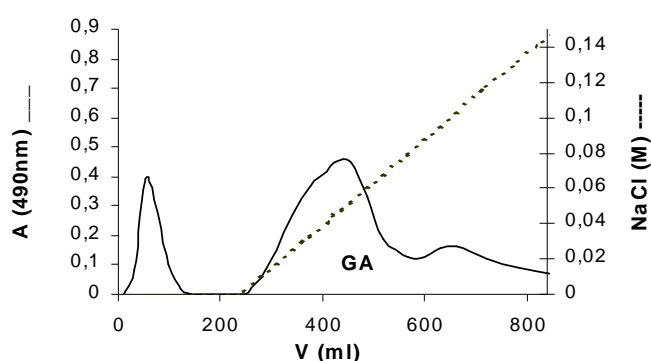
**Tabela 5:** Rendimentos, assinalamentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , e íons identificados na análise de ESIMS dos oligossacarídeos derivados da *theta*-carragenana carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato (TA) e carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato (TB).

Oligossacarídeo			TA		TB	
			12.8%		3.0%	
Rendimento			<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
Assinalamentos de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C	Galp (ext.)	1	4,54	103,0	4,59	102,4
		2	3,55	70,7	3,50	70,6
		3	3,68	72,6	3,68	72,5
		4	3,94	68,5	3,94	68,5
		5	3,75	75,2	3,74	75,2
		6	3,79	61,0	3,80	60,9
		6'	3,79		3,77	
	3,6-An-Galp	1			5,25	93,9
		2			4,64	74,8
		3			4,74	77,5
		4			4,67	77,7
		5			4,71	76,4
		6			4,10	69,5
		6'			4,24	
	Galp (int.)	1			4,57	102,8
		2			3,68	69,1
		3			3,87	81,2
		4			4,13	66,2
		5			4,64	74,9
		6			3,80	60,8
		6'			3,77	
	3,6-An-GalOH	1	3,89	60,5	3,89	60,5
		1'	3,89		3,89	
		2	4,57	77,9	4,56	77,8
		3	4,13	81,6	4,14	81,5
		4	4,34	86,3	4,36	86,3
		5	4,50	75,7	4,50	75,8
		6	4,03	72,6	4,03	72,6
		6'	3,85		3,66	
Íons - ESIMS			<i>m/z</i>		<i>m/z</i>	
	Modo positivo		451 [M+Na] <sup>+</sup>		859 [M+Na] <sup>+</sup>	
	Modo negativo		405 [M+Na] <sup>-</sup>		813 [M-Na] <sup>-</sup> 395 [M-2Na] <sup>2-</sup>	

#### 4.2.4. Oligossacarídeo proveniente de agarose 6-sulfato (*Gracilaria domingensis*).

Para obtenção do dissacarídeo monossulfatado,  $\beta$ -D-Galp 6-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato), o hidrolisado proveniente da agarose 6-sulfato foi processado como descrito por DUCATTI (2005): após eluição da coluna troca iônica em DEAE-Sephadex A-25 ( $\text{Cl}^-$ ) com água, a fração oligossacarídica presente no eluato do gradiente de NaCl (GA) foi recromatografada em BioGel P-2 para a eliminação dos sais. Ainda, uma purificação adicional foi realizada através de cromatografia de camada delgada preparativa. Observando-se o perfil de eluição da cromatografia de troca iônica na (**Figura 41**), nota-se uma intensa absorbância na fração referente ao eluato aquoso. Parte dessa absorção foi gerada pela interferência da metilmorfolina, o que já havia sido observado nos perfis cromatográficos das hidrólises da *kappa*- e *theta*-carragenana. Entretanto, no caso da agarose 6-sulfato, oligossacarídeos neutros são encontrados no eluato aquoso (DUCATTI, 2005) intensificando consideravelmente a absorção para o método fenol-sulfúrico. Porém, de acordo com os objetivos deste trabalho, procedeu-se somente a obtenção e purificação do dissacarídeo sulfatado.

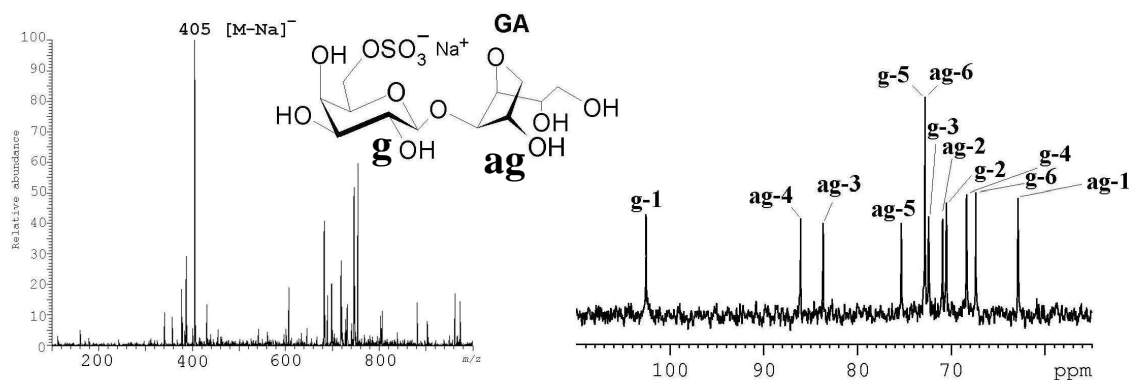
**Figura 41:** Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-25 ( $\text{Cl}^-$ ) do produto de HRP da agarose 6-sulfato.





Para fração GA, a análise de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT o sinal invertido correspondente ao C-6 da unidade de  $\beta\text{-D-Galp}$  6-sulfato com um deslocamento químico de 6,5 ppm em relação ao assinalamento de um dissacarídeo alditol não substituído, confirmando a substituição na posição esperada. Os experimentos de ESIMS nos modos positivo e negativo apresentaram resultados compatíveis com a estrutura identificada (**Figura 42**).

**Figura 42:** Espectros de ESIMS em modo negativo e RMN de  $^{13}\text{C}$  do agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (GA). No espectro de RMN, **g** e **ag** correspondem a Galp and 3,6-AnGalOH, respectivamente.



**Tabela 6:** Rendimento, assinalamentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , e íons identificados na análise de ESIMS do oligossacarídeo derivado da agarose 6-sulfato, agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (GA).

Oligossacarídeo		GA	
Rendimento		11.7%	
Assinalamentos de RMN de $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
	Galp	1	4,57 102,5
	(ext.)	2	3,54 70,5
		3	3,68 72,4
		4	3,98 68,4
		5	3,97 72,8
		6	4,21 67,4
		6'	4,21
	3,6-An-GalOH	1	3,73 62,9
		1'	3,66
		2	3,97 70,9
		3	3,93 83,7
		4	4,31 86,0
		5	4,40 75,3
		6	3,97 72,8
		6'	3,86
Íons - ESIMS	$m/z$		
	Modo positivo	451 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	
	Modo Negativo	405 $[\text{M}-\text{Na}]^-$	

#### 4.2.5. Discussão comparativa da HRP das diferentes galactanas sulfatadas estudadas.

Pode-se observar que os oligossacarídeos obtidos a partir de *theta*-carragenana apresentaram ausência absoluta de sulfato na posição 2 da unidade de  $\beta$ -D-Galp (esta substituição também era esperada nesta posição, conhecendo-se a estrutura do polissacarídeo). Em contraste, os grupos sulfato mantiveram-se ligados nos oligossacarídeos de *kappa*-carragenana. Aparentemente, as ligações dos grupos sulfato apresentam diferentes labilidades, de acordo com as posições

que ocupam. A labilidade em meio ácido, apresentado pelos grupos sulfatos, ligados na posição 2 da unidade de  $\beta$ -D-Galp, comparado a outras posições, foi também observada durante a autohidrólise de *lambda* e *theta* carragenanas (NOSEDA & CERREZO, 1993) e na HRP de agaranas sulfatadas e piruviladas da alga vermelha *Acanthophora spicifera* (GONÇALVES, 2001).

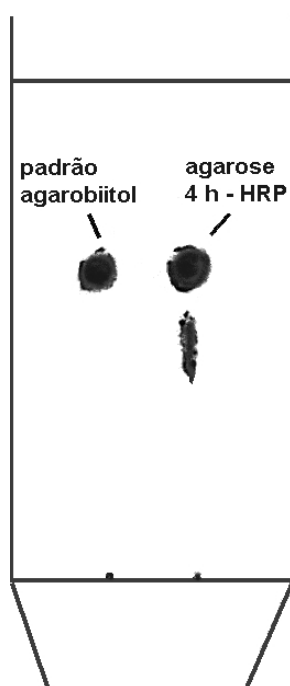
Na HRP da agarose 6-sulfato, ocorreu a formação somente do dissacarídeo ácido agarobiitol 6-sulfato, como esperado, de acordo com especificidade do método hidrolítico utilizado. Entretanto, a partir da *kappa*- e *theta*-carragenana foram produzidos di- e tetrassacarídeos. O posicionamento dos grupos sulfato destas carragenanas é específico para determinadas posições, ou seja, a *kappa*-carragenana apresenta grupos sulfato ligados em C-4 da unidade de  $\beta$ -D-Galp enquanto a *theta*-carragenana é sulfatada em C-2 das unidades de  $\beta$ -D-Galp e 3,6-An- $\alpha$ -D-Galp. Ambas carragenanas apresentam carbonos sulfatados que estão a uma ligação de distância dos carbonos diretamente envolvidos na ligação 3,6-anidrogalactosídica. Em contraste, os grupos sulfato na agarose 6-sulfato estão três ligações distantes da ligação a ser hidrolisada. Estes dados sugerem que a presença de um grupo sulfato próximo a ligação 3,6-anidrogalactosídica talvez dificulte a HRP.

A HRP dos extratos brutos submetidos a tratamento alcalino da alga *A. spicifera*, gerou somente dissacarídeos alditóis (GONÇALVES, 2001). Entretanto, foi isolado um tetrassacarídeo a partir de uma fração polissacarídica purificada e tratada, extraída da mesma alga. Apesar disto, tetrassacarídeos e oligossacarídeos com maior grau de polimerização são encontrados apenas como produtos minoritários (< 0,1 %) nos produtos de hidrólise das galactanas, extraídas desta alga, submetidas a tratamento alcalino.

#### 4.2.6. HRP da agarose neutra comercial

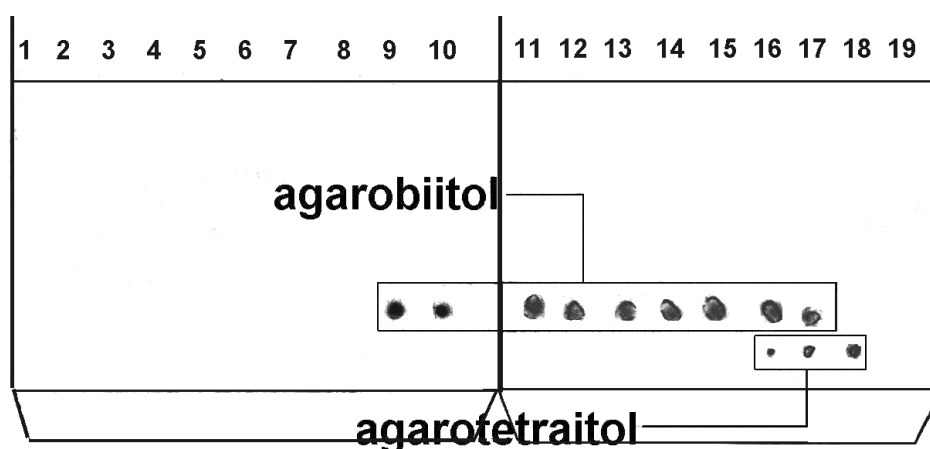
A agarose comercial Tipo I foi submetida a HRP (**Figura 43**) com intuito de se obter uma quantidade grande do dissacarídeo alditol neutro (agarobiitol) e de seu análogo tetrassacarídico (agarotetraitol). Para este experimento, o tempo de hidrólise foi reduzido para 4 h. Esta alteração foi introduzida de acordo com a experiência adquirida nas etapas anteriores, que indicava que o tempo normal de HRP (8 h) resultaria na formação exclusiva do agarobiitol.

**Figura 43:** Cromatografia de camada delgada referente a 4 h de HRP da agarose comercial.



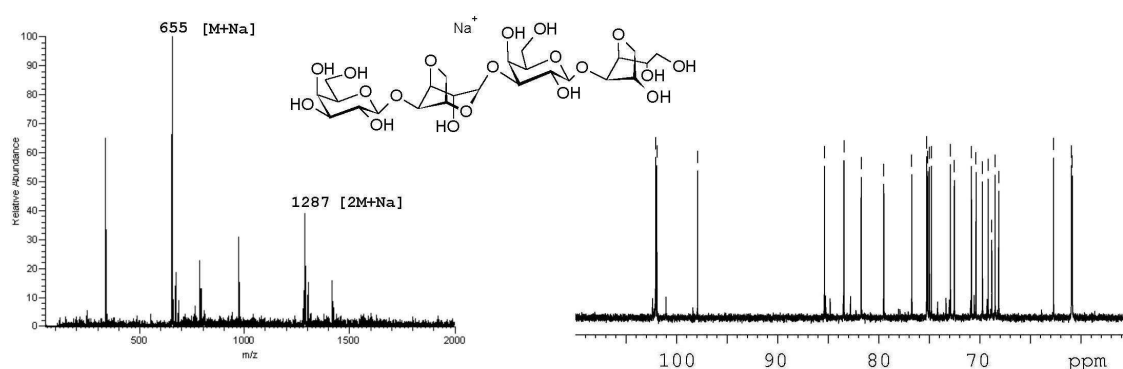
Sabendo que a agarose comercial daria origem somente a oligossacarídeos neutros, foi utilizada uma estratégia diferenciada de fracionamento e purificação do material hidrolisado. Após a remoção do TFA e evaporação do meio reacional até a secura, o resíduo foi ressuspense em metanol com subsequente filtração; deste modo foram removidos os fragmentos de polissacarídeos e oligossacarídeos maiores que poderiam dificultar o passo cromatográfico final de purificação. O filtrado foi submetido a redução de volume sob pressão reduzida, sendo posteriormente adicionado 10 volumes de acetato de etila sobre a solução metanólica concentrada; nesta etapa foi precipitado todo o componente oligossacarídico sendo que impurezas, como a metilmorfolina, permaneceram em solução. A suspensão resultante foi deixada em repouso com o objetivo de se obter um precipitado através de centrifugação. O *pellet* obtido foi cromatografado em sílica com 8:2:1 (acetato de etila:metanol:água) para obtenção de duas frações: uma contendo do agarobiitol livre de qualquer contaminante e outra contendo uma mistura do di- e do tetrassacarídeo alditol (**Figura 44**). Para a obtenção do tetrassacarídeo livre da contaminação por agarobiitol, foi necessário recromatografar as frações que apresentavam a mistura dos dois oligossacarídeos.

**Figura 44:** Cromatografia de camada delgada das frações cromatográficas obtidas a partir da cromatografia em coluna de sílica.



A fração tetrassacarídica purificada foi então submetida às análise de RMN e ESIMS, as quais apresentaram resultados compatíveis com os de tetrassacarídeo alditol neutro  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3,6-An-L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarotetraitol - **Figura 45**).

**Figura 45:** Espectros de ESIMS em modo positivo e RMN de  $^{13}\text{C}$  do agarotetraitol.



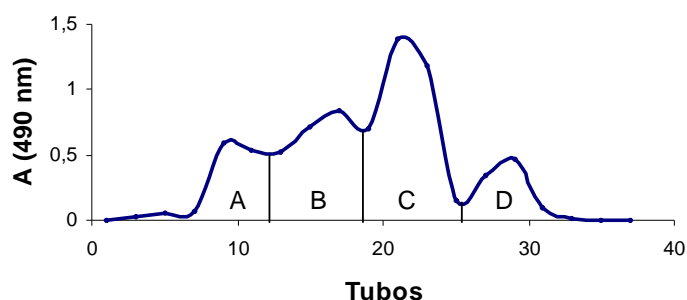
### 4.3. HIDRÓLISE PARCIAL COM HCl

#### 4.3.1. Oligossacarídeo proveniente de agarose comercial:

Visando estabelecer condições de hidrólise para obtenção de oligossacarídeos redutores, foi realizada hidrólise da agarose comercial (agarana neutra completamente ciclizada) com HCl concentrado, à temperatura ambiente por 30 min. Após a hidrólise, a solução foi parcialmente neutralizada com o uso de bicarbonato de sódio até pH 6. Para diminuir a grande quantidade de sais, a solução resultante da neutralização foi levada a secar e então submetida extração dos oligossacarídeos com DMSO. A recuperação dos oligossacarídeos em DMSO foi realizada através da precipitação com adição de 3 volumes de clorofórmio. Através deste procedimento, a quantidade de sal foi substancialmente diminuída, sendo possível realizar a cromatografia em BioGel P-2 para a

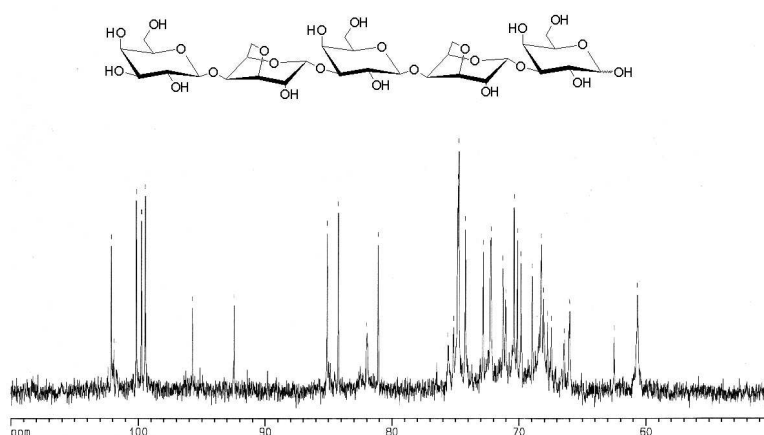
eliminação do sal residual. O perfil de eluição obtido indicou a presença de quatro possíveis frações (A, B, C e D – **Figura 46**).

**Figura 46:** Perfil de eluição da cromatografia de filtração em gel (BioGel P-2) do produto de hidrólise ácida parcial com HCl concentrado em agarose neutra comercial.



A fração principal (C) foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração C (**Figura 47**), indicando ser composta por um pentassacarídeo neutro:  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-3,6-An-L-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-3,6-An-L-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-D-Galp}$ .

**Figura 47:** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  e estrutura química do pentassacarídeo neutro:  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-3,6-An-L-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-3,6-An-L-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-D-Galp}$ .



Com este tipo de hidrólise, o oligossacarídeo obtido apresentou resíduos de D-Gal tanto na ponta redutora quanto na extremidade não redutora, ou seja, um oligossacarídeo com número ímpar de unidades glicosil. Já na HRP, os oligossacarídeos alditóis obtidos neste e em outros trabalhos (USOV & ELASHVILI, 1991; USOV & ELASHVILI, 1997; GONÇALVES, 2001; DUCATTI 2005) apresentam sempre número par de unidades, respeitando as díades que compõem carragenanas e agaranas ciclizadas,  $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4\text{-)3,6-An-}\alpha\text{-Galp-(1}\rightarrow ]$ . Oligossacarídeos redutores derivados de galactanas de algas marinhas, com número par de resíduos podem ser obtidos com o uso de  $\beta$ -agarases ou  $\beta$ -carragenases, sendo sempre uma unidade de D-Gal o terminal redutor e uma unidade de 3,6-An- $\alpha$ -Galp como extremidade não redutora (DUCKWORTH & YAPHE, 1971; MORRICE *et al.*, 1983; KNUTSEN *et al.*, 2001). Hidrólises utilizando  $\alpha$ -agarases (YOUNG *et al.*, 1978), ou hidrólises ácidas mais brandas (IZUMI, 1973), da mesma forma, geram oligossacarídeos compostos de unidades aos pares com terminais de 3,6-AnGal na forma de um aldeído hidratado.

Essas observações são facilmente explicadas pela suscetibilidade a hidrólise das ligações 3,6-anidrogalactosídicas e pela instabilidade em meio ácido apresentada pelas unidades de 3,6-AnGal. Na HRP, as ligações 3,6-anidrogalactosídicas são hidrolisadas com concomitante proteção, através de redução, dos terminais de 3,6-AnGal; enquanto na hidrólise enzimática por  $\beta$ -galactosidases, as ligações 3,6-anidrogalactosídicas são poupadas devido ao ataque específico das  $\beta$ -galactosidases nas ligações  $\beta$ -D-galactosídicas. Com o uso de  $\alpha$ -agarases, não ocorre degradação dos resíduos terminais de 3,6-AnGal, uma vez que na hidrólise enzimática não são utilizadas faixas de pH extremas. Já nas condições da hidrólise parcial com HCl descritas por HIRASE (1957) e IZUMI (1973), apesar da exposição dos resíduos de 3,6-AnGal ao meio ácido, a combinação de concentração de ácido (0,1 M), tempo de hidrólise (20 min) e temperatura (95°C) não provoca degradação de forma efetiva. Nos trabalhos de YU *et al.* (2002), é usada a mesma concentração de HCl (0,1 M), menor temperatura (60°C) e um tempo de hidrólise 9 vezes maior (3 h), sendo que esta

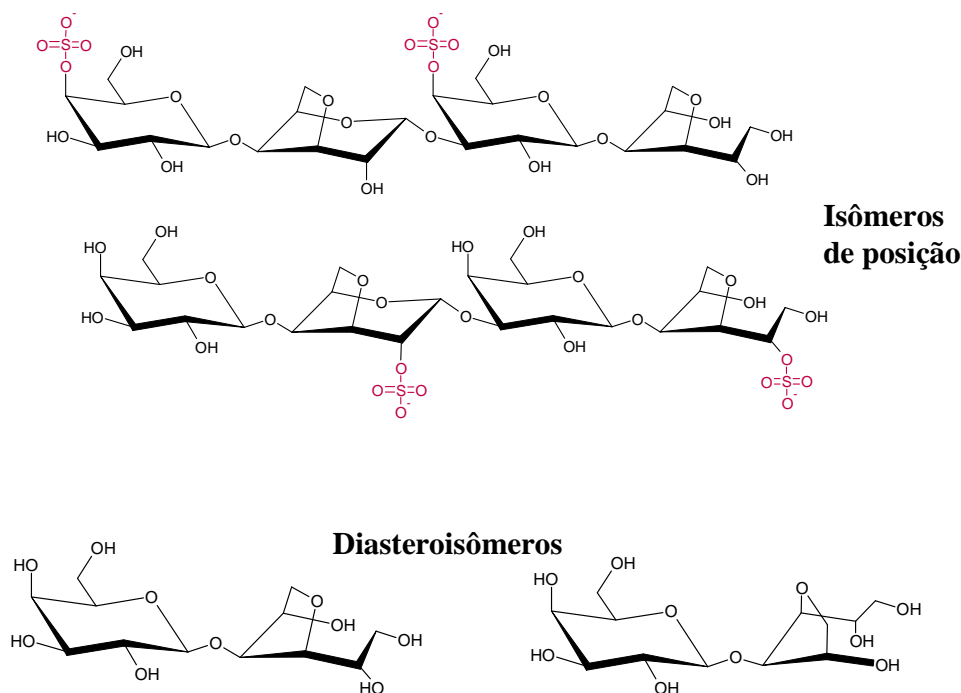


condição levou a uma degradação efetiva das unidades de 3,6-AnGal terminais. Já o experimento realizado no presente trabalho, tem como condições HCl conc., 25°C, 30 min, ou seja, menor tempo, menor temperatura e concentração de ácido várias vezes maior. Estas condições também levaram a degradação das unidades de 3,6-AnGal terminais, sendo possível concluir que os fatores tempo e concentração de ácido são mais relevantes que a temperatura no que se refere a manutenção da integridade destas unidades.

#### **4.4. ESTUDO DE OLIGOSSACARÍDEOS ISÔMEROS DE POSIÇÃO DE GRUPOS SULFATO POR DISSOCIAÇÃO INDUZIDA POR COLISÃO (CID) - ESI-MS/MS.**

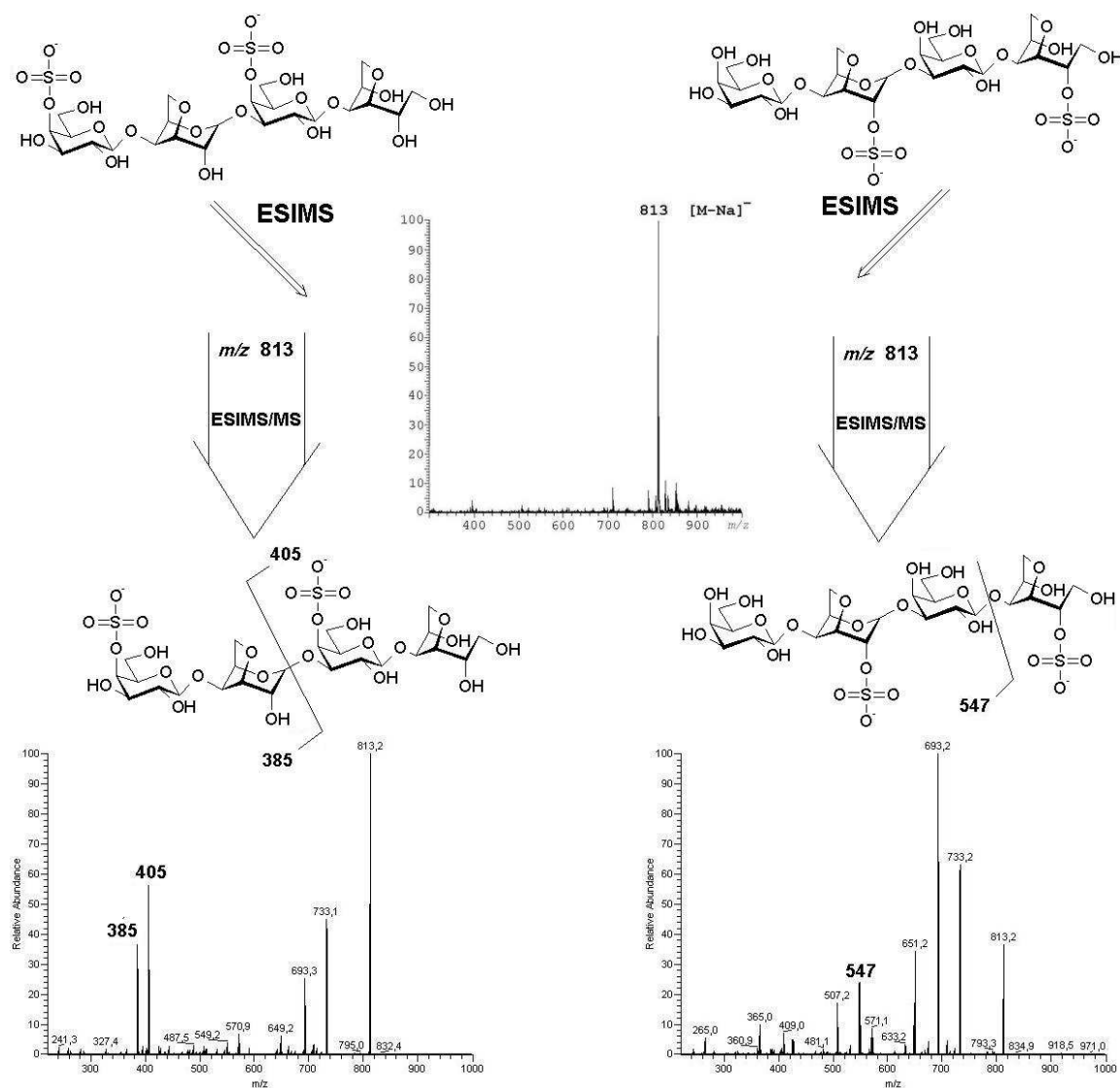
A determinação do posicionamento dos grupos sulfato em oligossacarídeos sulfatados derivados de galactanas de algas marinhas é normamente realizada por análises de RMN. Apesar da eficiência desta técnica, problemas com tempo de análise e sensibilidade são comuns, principalmente com relação à RMN-<sup>13</sup>C. Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado a possibilidade do estudo de oligossacarídeos sulfatado por técnicas de eletrospray (THOMSSON *et al.*, 1999; THOMSSON *et al.*, 2000; EKEBERG *et al.*, 2001). Neste trabalho, os oligossacarídeos obtidos foram extensivamente estudados por esta técnica. Entretanto, muitas das estruturas obtidas são isômeros, ou de posição ou diastereoisômeros (**Figura 48**), assim, as análises de íons pais, fornecem muitos resultados iguais para oligossacarídeos diferentes.

**Figura 48:** Exemplos de oligossacarídeos alditóis isômeros: carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato e carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato (isômeros de posição); agarobiitol e carrabiitol (diastereoisômeros).



Deste modo, os isômeros de posição carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato e carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato (previamente caracterizados por RMN e ESIMS) foram submetidos à análise de ESIMS/MS através de dissociação induzida por colisão (CID – “collision induced dissociation”). Nesta análise, o íon pai obtido numa análise ESIMS (um quadrupolo) é fragmentado por uso de gás argônio, gerando íons filhos que são analisados por um segundo quadrupolo. A partir deste experimento foi observado que a via de fragmentação foi distinta para os dois tetrassacarídeos isômeros (**Figura 49**).

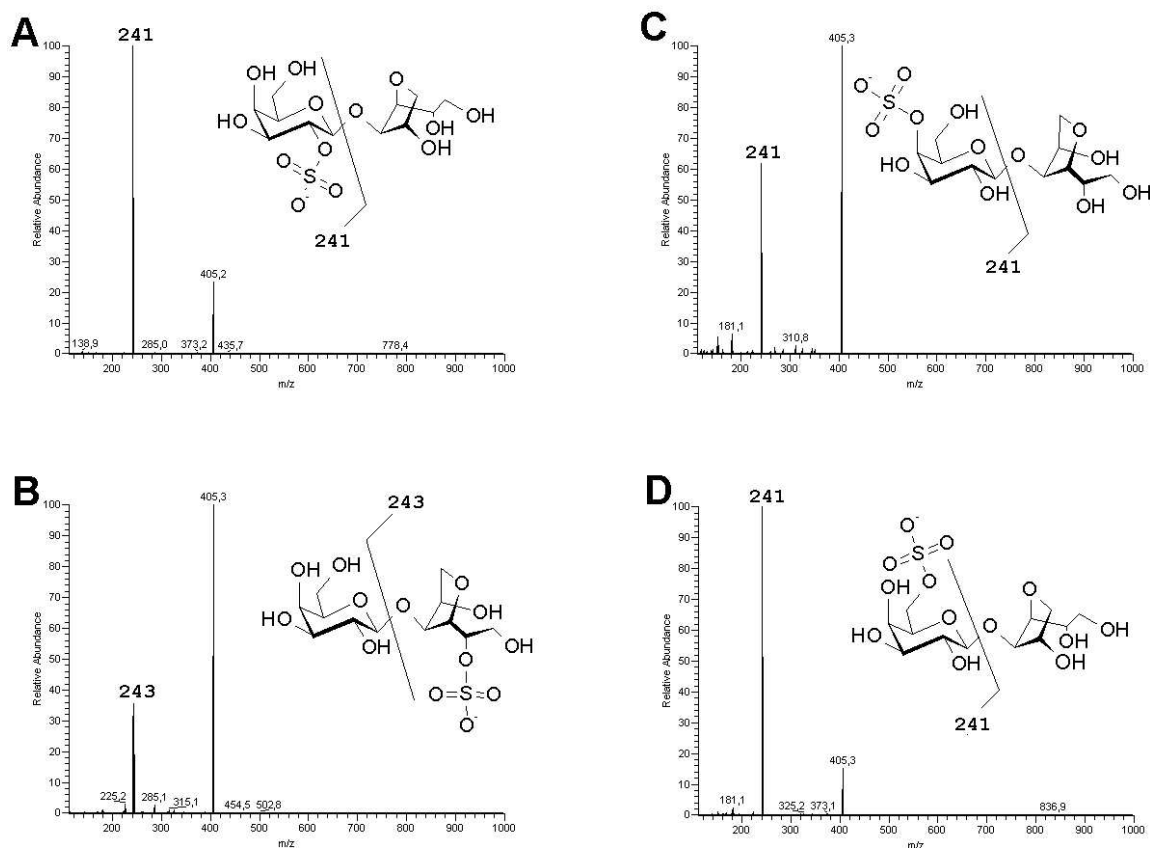
**Figura 49:** Fragmentação diferencial entre os isômeros carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato e carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato com ESIMS/MS em modo negativo do íon  $m/z$  813.



Os fragmentos considerados diferenciais foram  $m/z$  405 e 385 (carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato), e  $m/z$  547 (carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato) por serem exclusivos para cada isômero. Além destes íons, foram encontrados vários fragmentos comuns aos dois isômeros, a maioria deles originados a partir da perda de grupos SO<sub>3</sub> e/ou SO<sub>4</sub>, tais como,  $m/z$  733 e 693. Essas análises foram realizadas também em modo positivo, apresentando um perfil de fragmentação equivalente ao encontrado no modo negativo, ressaltando-se que os valores de  $m/z$  apresentaram-se acrescidos da massa de um ou dois átomos de sódio.

A partir destas constatações, foram realizadas as análises de ESIMS/MS dos dissacarídeos isômeros carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato, carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato, agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato e agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato. Neste caso, somente o carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato apresentou um fragmento diferente dos demais dissacarídeos monossulfatados. Esse fato é explicado pela presença do grupo sulfato na unidade 3,6-anidrogallactopiranosídica do carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato, o que ocorre na unidade de β-D-Galp dos outros dissacarídeos analisados (**Figura 50**).

**Figura 50:** Fragmentação dos isômeros agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato(A), carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato (B), agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (C) e carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato (D) com ESIMS/MS em modo negativo do íon  $m/z$  405.



Diferentemente do que ocorre nas análises de ESIMS para íons pais, na análise de ESIMS/MS, o espectro referente aos íons filhos de um determinado íon pai, conterá somente valores de massas referentes aquele íon pai de escolha, não havendo, portanto, massas originadas ou pertencentes a contaminantes. Deste modo, o estudo da fragmentação por ESIMS/MS com CID, pode ser realizado com maior confiabilidade. Foi possível demonstrar ainda a fragmentação diferencial de alguns isômeros de posição de grupo sulfato, especificamente para aqueles onde a sulfatação ocorre em unidades monossacarídeicas diferentes.

#### 4.5. ELETROFORESE CAPILAR

No decorrer do trabalho percebeu-se a necessidade de monitoramento dos processos hidrolíticos a fim de propiciar a obtenção de oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização. Para tal, foi utilizada a técnica de EC, que oferece várias vantagens sobre outros métodos analíticos, tais como: é uma técnica apropriada para análise de moléculas carregadas; proporciona alta velocidade de análise quando comparada a processos eletroforéticos convencionais; possibilita desenvolvimento de métodos de alta resolução de análise; baixo custo operacional e baixíssimo consumo de amostra.

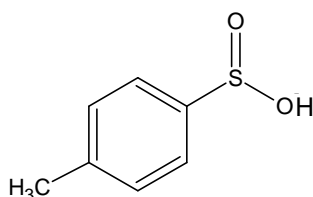
Para o desenvolvimento de um método eficiente em termos de separação e detecção, foram utilizados os seguintes oligossacarídeos alditóis: 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol; agarobiitol-2<sup>2</sup>-sulfato; carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato; carratetraitol-2<sup>1</sup>-2<sup>3</sup>-dissulfato; carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato; carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato e agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato.

As primeiras condições de eletroforese capilar utilizadas foram baseadas como descrito por CARNEY e OSBOURNE (1991): 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 10 mM de tetraborato, pH 9, 15 kV, 40 °C. As análises iniciais dos oligossacarídeos alditóis demonstraram uma baixíssima sensibilidade do método. Esse fato pode ser explicado pela absorvidade praticamente nula apresentada por carboidratos na região do ultravioleta (o aparelho utilizado é equipado com detector por absorção no UV). Apesar da maior absorvidade molar apresentada por complexos polióis-borato em relação a polióis não complexados (HOFFSTETTER-KUHN *et al.*, 1991), foi utilizada uma estratégia de detecção que proporcionasse maior sensibilidade.

Uma vez que oligossacarídeos alditóis não possuem um terminal redutor, o que não permite a inserção de cromóforos para detecção direta por UV, foi testada um modo de detecção indireta. Na detecção indireta, o “background” de absorção de UV gerado por um co-íon detectável, presente no tampão, é interrompido quando o oligossacarídeo passa pelo detector, gerando um pico negativo, referente ao analito em questão. Através de um artifício oferecido pelo aparelho,

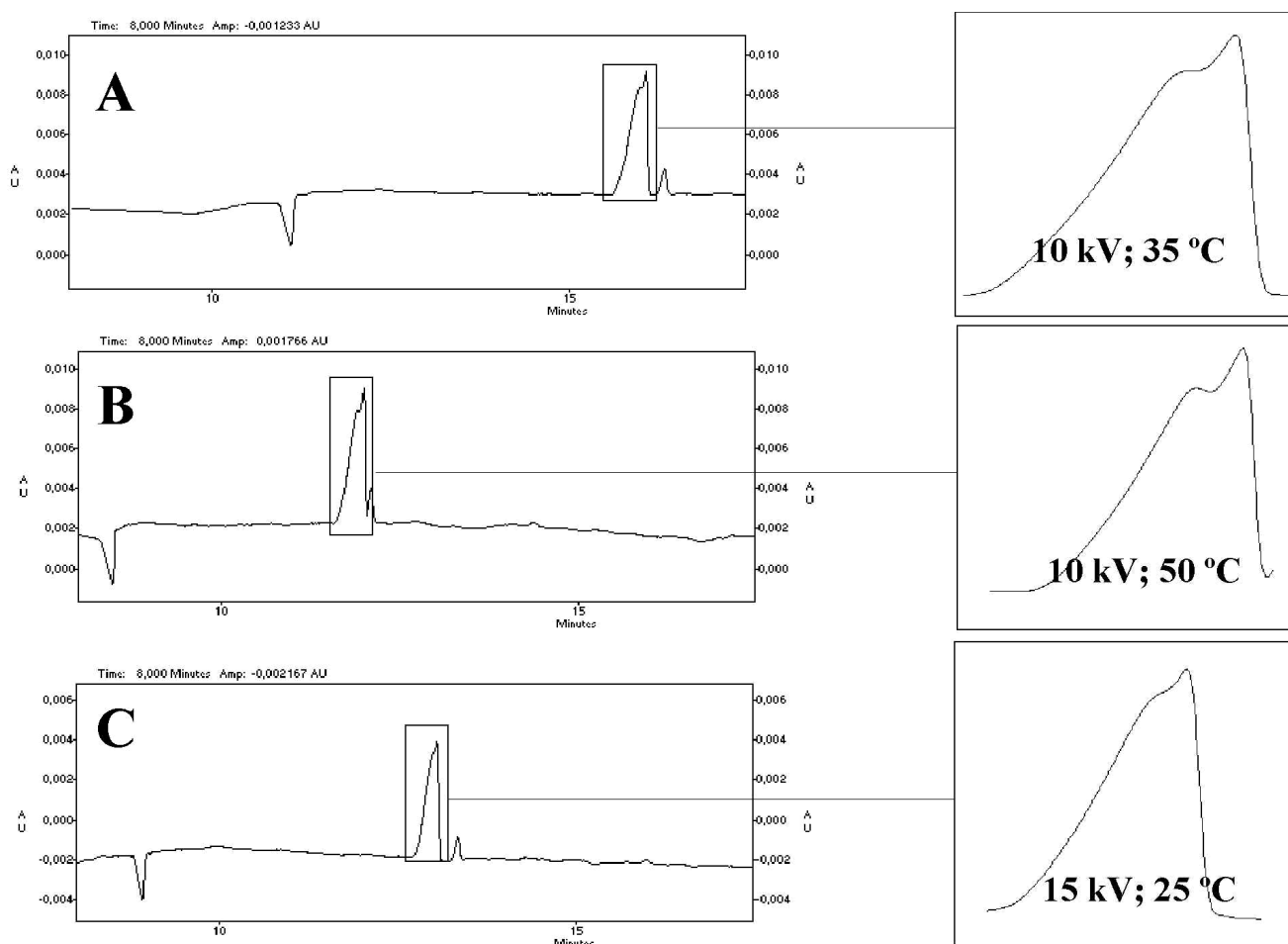
este pico pôde ser adquirido como positivo. Para tal, foi testado o ácido *p*-toluenosulfínico (TSA - **Figura 51**), uma vez que este apresentava características apropriadas de um co-íon para a análise de moléculas negativamente carregadas: alta absorvidade molar na região ultravioleta e mobilidade similar aos dos analitos em questão (DOBLE & HADDAD, 1999).

**Figura 51:** Estrutura química do ácido *p*-toluenosulfínico (TSA).



O TSA (sal sódico) foi então acrescentado a uma concentração de 10 mM ao tampão, e a partir da injeção dos padrões, percebeu-se que a sensibilidade proporcionada pela detecção indireta era suficiente para as análises pretendidas. Para verificar a eficiência de separação do tampão resultante (40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 10 mM de tetraborato, 10 mM de TSA, pH 9, 15 kV, 40°C), foi utilizada uma mistura dos oligossacarídeos alditóis, isômeros de posição de grupo sulfato, carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato. Estas condições não se mostraram suficientes para promover a separação dos dois isômeros, de forma que somente um pico era visualizado no eletroferograma resultante. Com o intuito de aumentar o nível de complexação dos oligossacarídeos com os íons borato presentes no tampão, o tampão foi alcalinizado até pH 10. Nestas condições ocorreu um princípio de resolução entre os isômeros, a qual foi notada pelo aparecimento de um ombro no pico referente a mistura de isômeros. Subseqüentemente, na tentativa de melhorar a resolução, foram testadas algumas condições diferentes de temperatura e voltagem. Entretanto, as alterações inseridas no método de separação não foram suficientes para a resolução completa dos analitos em questão (**Figura 52**).

**Figura 52:** Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato em diferentes temperatura e voltagens. Tampão: 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 10 mM de tetraborato, 10 mM de TSA, pH 10. **(A)** eletroforese realizada a 10 kV e 35°C; **(B)** 10 kV e 50°C; **(C)** 15 kV e 25°C.

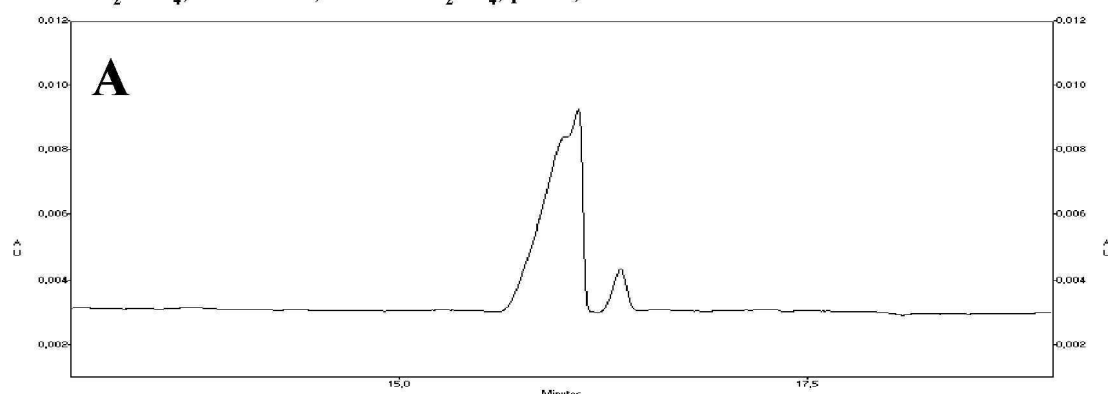




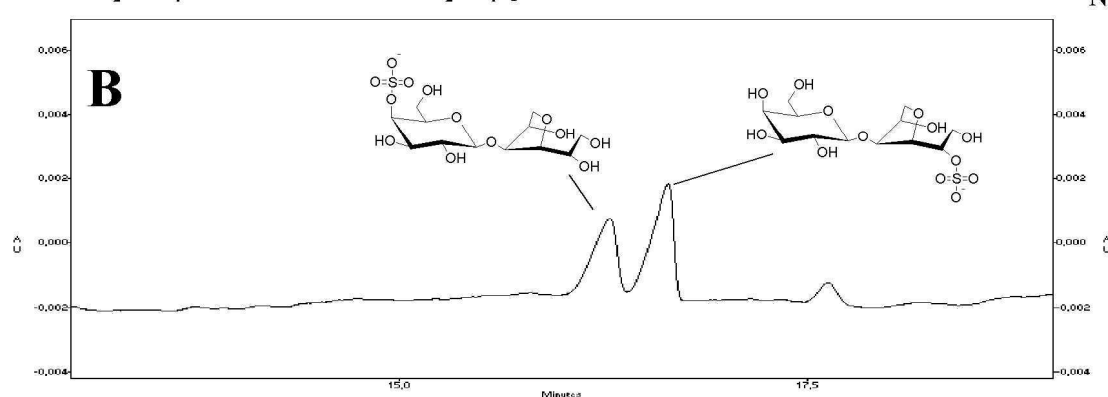
Uma vez que o aumento do pH (o que aumenta o nível de complexação com íons borato) proporcionou um princípio de resolução entre os isômeros, foram acrescidos mais 10 mM de íons borato ao tampão de trabalho. Com esta modificação obteve-se resolução completa entre carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato (**Figura 53**).

**Figura 53:** Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato variando-se a concentração de íons borato. **(A)** 10 mM de borato **(B)** 20 mM de borato.

40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40mM SDS; 10 mM Na<sub>2</sub>BO<sub>4</sub>; pH 10; 10 mM TSA

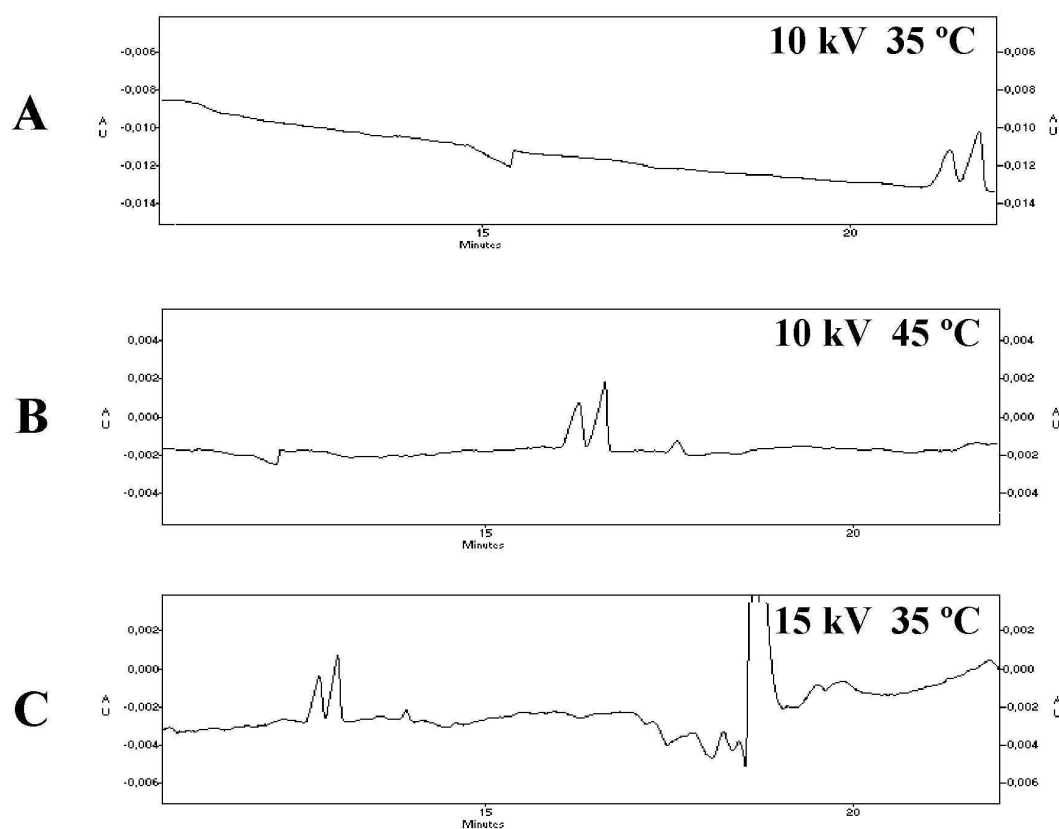


40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40mM SDS; 20 mM Na<sub>2</sub>BO<sub>4</sub>; pH 10; 10 mM TSA



Determinada a concentração ideal de íons borato, foram testadas diferentes voltagens e temperaturas para aumento da velocidade de análise sem prejuízo da qualidade do eletroferograma resultante (**Figura 54**).

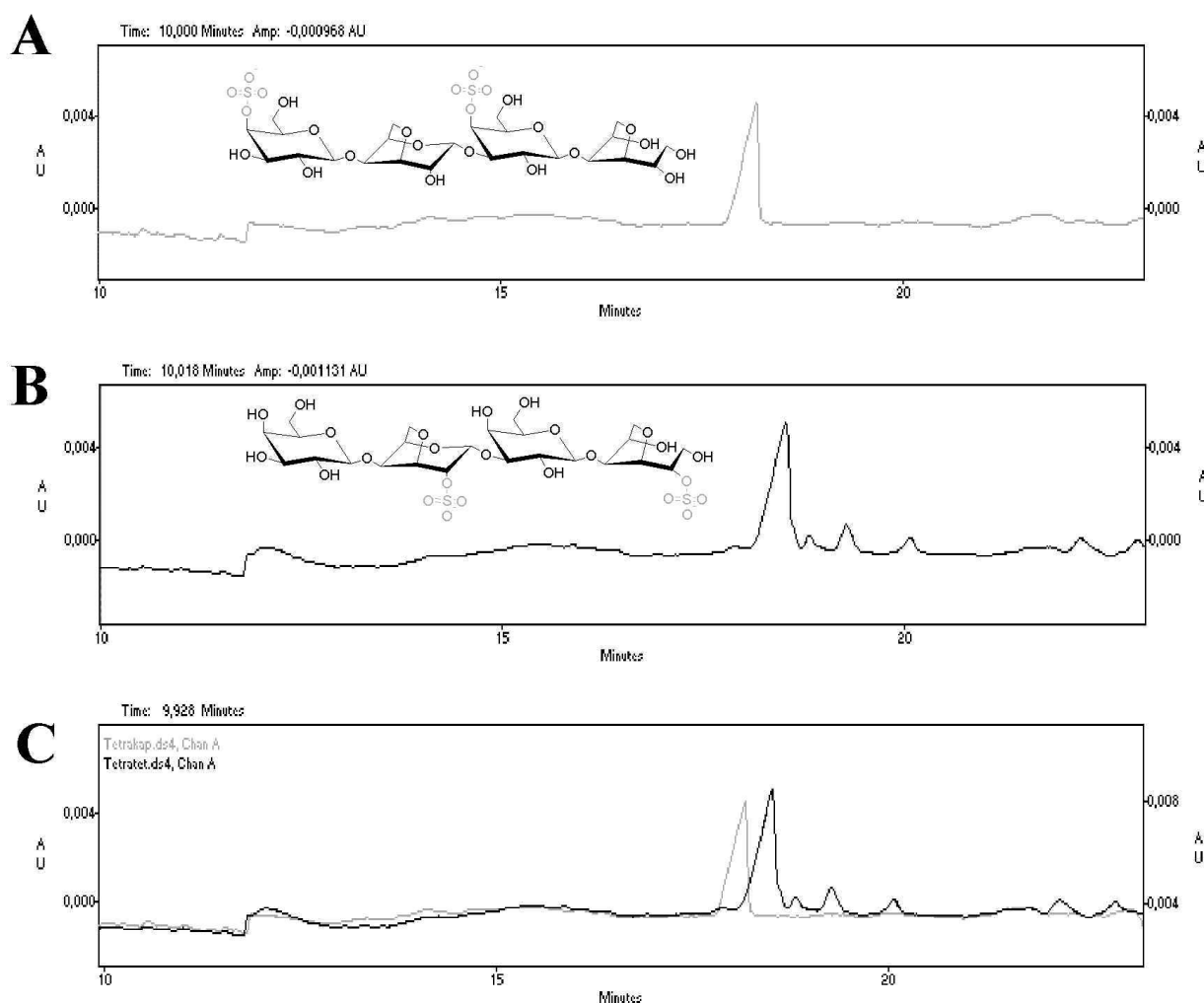
**Figura 54:** Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato em diferentes temperatura e voltagens. Tampão: 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 20 mM de tetraborato, 10 mM de TSA, pH 10. **(A)** eletroforese realizada a 10 kV e 35°C; **(B)** 10 kV e 45°C; **(C)** 15 kV e 35°C.



As condições selecionadas para continuação do trabalho foram 10 kV e 45°C (**Figura 54 B**). Com uma temperatura menor a análise mostrou-se demorada e houve perda de resolução (**Figura 54 A**) e com o aumento da voltagem ocorreu desestabilização da linha de base (**Figura 54 C**).

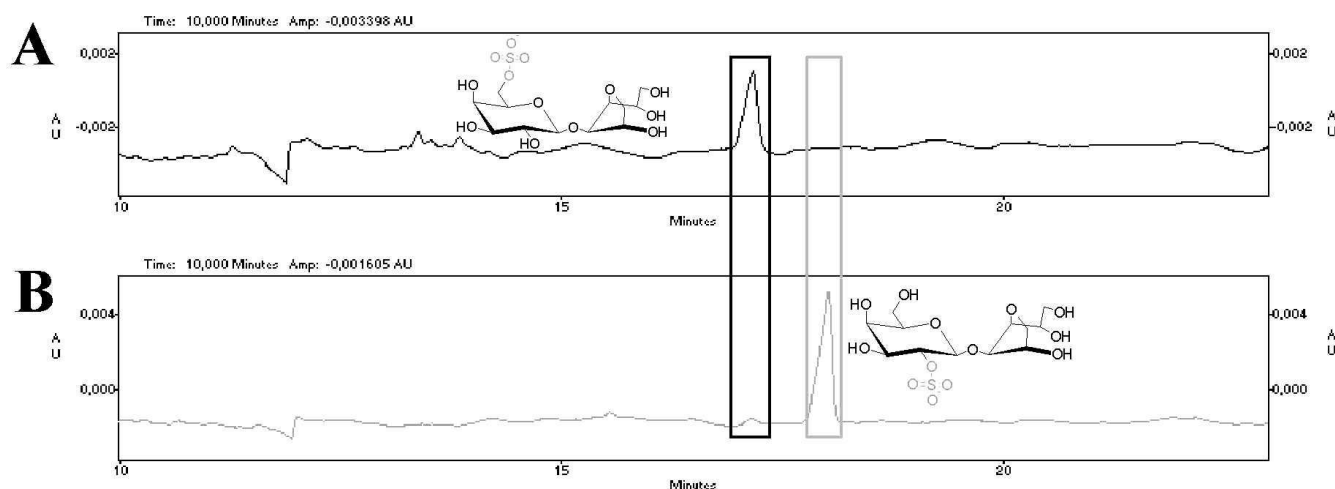
Com o estabelecimento dos parâmetros eletroforéticos, foram realizadas injeções isoladas do par isomérico dos tetrassacarídeos correspondentes: carratetraitol-4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato e carratetraitol-2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato. Utilizando o recurso de sobreposição dos eletroferogramas, foi possível constatar a resolução completa entre estas duas espécies (**Figura 55**).

**Figura 55:** Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição carratetraitol-4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato (**A**) e carratetraitol-2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato(**B**). Eletroferograma (**C**) corresponde à sobreposição de (**A**) e (**B**). Tampão: 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 10 mM de tetraborato, 10 mM de TSA, pH 10. Eletroforese realizada a 10 kV e 45°C.



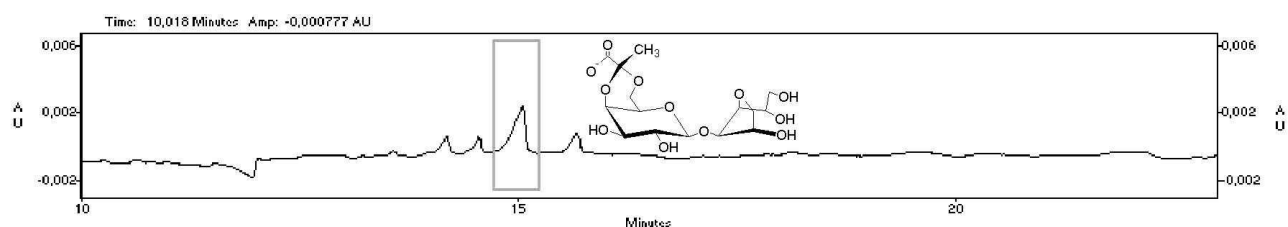
O mesmo procedimento realizado para carratetraitol-4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato e carratetraitol-2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato foi aplicado aos isômeros derivados de agarana agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato e agarobiitol-2<sup>2</sup>-sulfato. Os agarobiitóis monossulfatados (**Figura 56**) apresentaram uma maior resolução entre picos ( $R_{GAWA}=2,7$ ) quando comparados aos outros dois pares isoméricos analisados (**Tabela 7**).

**Figura 56:** Eletroferogramas correspondentes às análises dos isômeros de posição agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (**A**) e agarobiitol-2<sup>2</sup>-sulfato (**B**). Tampão: 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 10 mM de tetraborato, 10 mM de TSA, pH 10. Eletroforese realizada a 10 kV e 45°C.



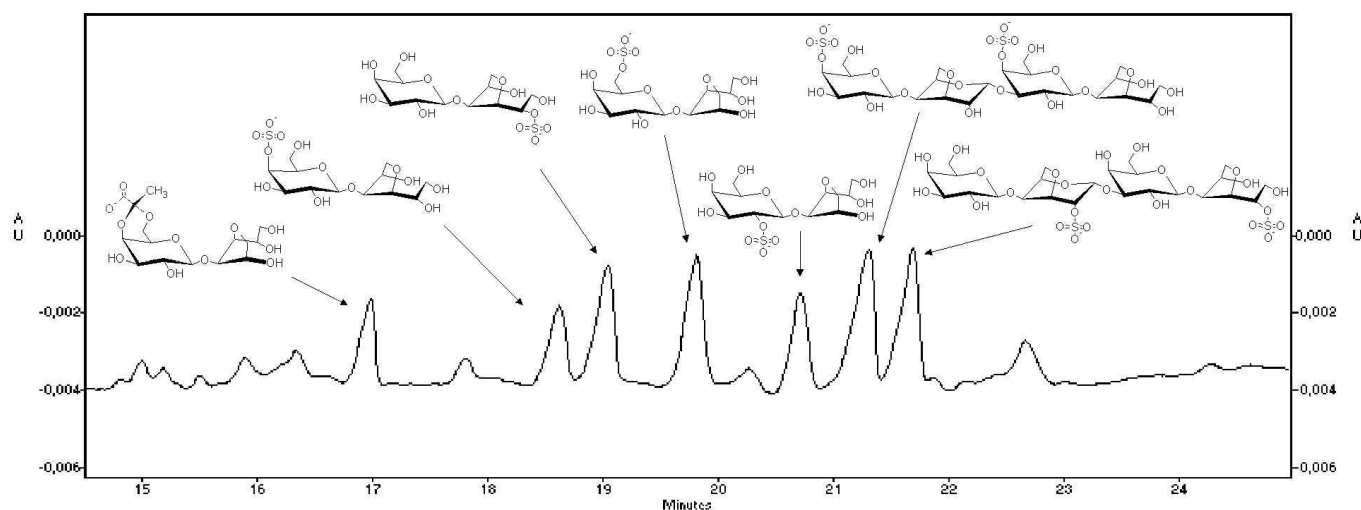
O oligossacarídeo alditol substituído por acetal de ácido pirúvico, 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol, também foi submetido a mesma análise apresentando um tempo de retenção menor que dos oligossacarídeos sulfatados (**Figura 57**)

**Figura 57:** Eletroferograma correspondente à análise do 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol. Tampão: 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 10 mM de tetraborato, 10 mM de TSA, pH 10. Eletroforese realizada a 10 kV e 45°C.



De posse do tempo de retenção de todos os padrões utilizados, foi feita uma mistura de todos os oligossacarídeos alditóis analisados e posterior análise eletroforética da mesma (**Figura 58 – Tabela 7**).

**Figura 58:** Eletroferogramas da mistura dos oligossacarídeos 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol; carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato; carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato; agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato; agarobiitol-2<sup>2</sup>-sulfato; carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato; carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato. Tampão: 40 mM de fosfato, 40 mM de SDS, 10 mM de tetraborato, 10 mM de TSA, pH 10. Eletroforese realizada a 10 kV e 45°C.



**Tabela 7:** Tempos de retenção e resolução entre picos<sup>a</sup> dos oligossacarídeos 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol (WB); carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato (KA); carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato (TA); agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (GA); agarobiitol-2<sup>2</sup>-sulfato (WA); carratetraitol-4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato (KB); carratetraitol-2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato (TB). As condições eletroforéticas foram as mesmas utilizadas na **Figura 58**.

	WB	KA	TA	GA	WA	KB	TB
Tempo de retenção	16,9	18,6	19,0	19,8	20,7	21,2	21,6
Resolução entre picos	$R_{WB/KA} = 5,3$	$R_{KA/TA} = 1,2$	$R_{TA/GA} = 2,1$	$R_{GA/WA} = 2,7$	$R_{WA/KB} = 1,6$	$R_{KB/TB}=1,0$	
	$R_{WB/TA} = 6,2$	$R_{KA/GA} = 3,6$	$R_{TA/WA} = 4,6$	$R_{GA/KB} = 4,1$	$R_{WA/TB} = 2,7$		
	$R_{WB/GA} = 9,2$	$R_{KA/WA} = 6,3$	$R_{TA/KB} = 5,8$	$R_{GA/TB} = 5,2$			
	$R_{WB/WA} = 12,2$	$R_{KA/KB} = 7,4$	$R_{TA/TB} = 6,8$				
	$R_{WB/KB} = 12,9$	$R_{KA/TB} = 8,5$					
	$R_{WB/TB} = 14,1$						

<sup>a</sup> $R_{X/Y} = 2(X - Y) / (X_w + Y_w)$ ; onde X e Y são os tempos de retenção em minutos, e  $X_w$  e  $Y_w$  são as larguras dos picos correspondentes

Considerando as estruturas químicas dos oligossacarídeos alditóis e seus respectivos tempos de retenção, pode-se levar em conta dois fatores que proporcionaram suas separações com o método eletroforético desenvolvido:

- A acidez dos oligossacarídeos (devido a grupos sulfato e / ou carboxilas);

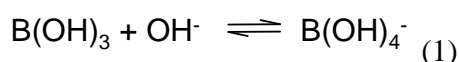
- O aumento do pH e da concentração de íons borato, o que permitiu uma complexação mais efetiva dos ânions tetraidroxiborato com as hidroxilas dos oligossacarídeos (HOFFSTETTER-KUHN *et al.*, 1991).

O 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol foi o padrão que apresentou menor tempo de retenção devido sua menor acidez: o grupamento carboxílico apresenta menor acidez em relação ao grupo sulfato (presente nas outras estruturas). Conseqüentemente, a base conjugada dos grupos sulfato é mais fraca, proporcionando uma carga negativa mais intensa em relação à carboxila. Desta

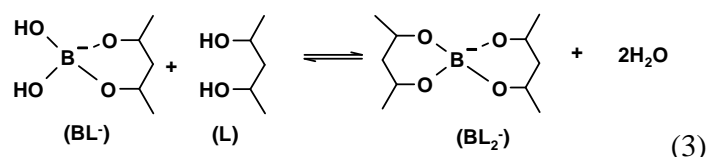
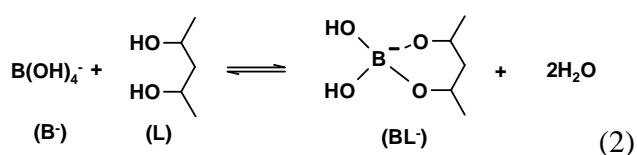
forma, o oligossacarídeo contendo acetal de ácido pirúvico migrará mais rapidamente em direção ao cátodo (pólo negativo) por apresentar uma carga “menos negativa” em relação aos oligossacarídeos sulfatados.

Sabendo que os quatro dissacarídeos alditóis monossulfatados apresentam o mesmo grupo negativamente carregado (sulfato) e a mesma relação massa/carga, uma proposta viável para explicar a resolução entre estas estruturas é diferente complexação com íons borato apresentada pelas mesmas.

Neste contexto, o átomo de boro é um elemento único em que seu oxiácido  $B(OH)_3$  (ácido bórico) é convertido num oxiânion tetraédrico  $B(OH)_4^-$  (tetraidroxiborato) em soluções básicas (ISHIHARA *et al.*, 1994). O equilíbrio (1) apresenta a formação de  $B(OH)_4^-$  a partir de  $B(OH)_3$  em soluções alcalinas:



O ânion tetraidroxiborato é conhecido por sua propriedade de formar complexos negativamente carregados com hidroxilas vicinais *cis* de carboidratos, principalmente em alto pH (HOFFSTETTER-KUHN *et al.*, 1991; SCHIMITT-KOPPLIN *et al.*, 1998). Os equilíbrios (2) e (3) mostram a formação do monocomplexo 1:1 ( $BL^-$ ) e do dicomplexo 1:2 ( $BL_2^-$ ):



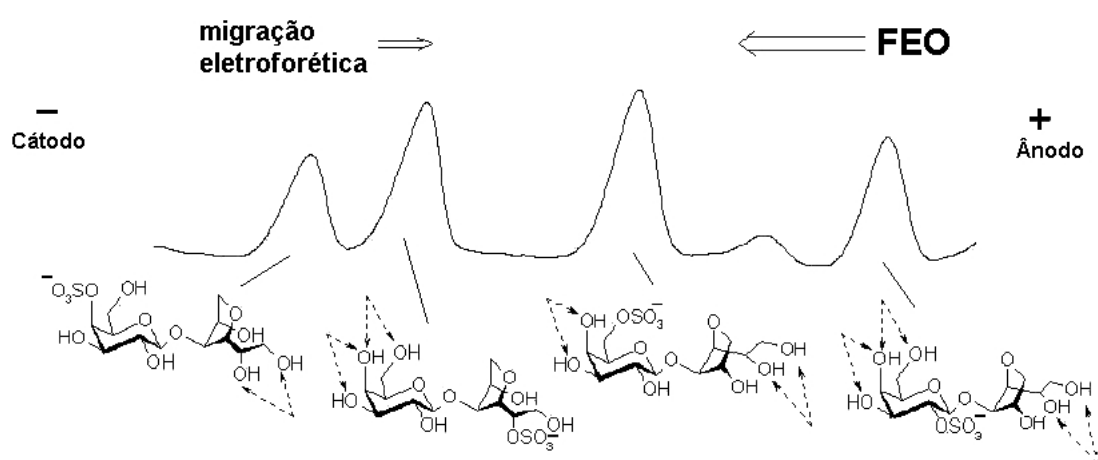
Esta complexação induz mudanças nas relações carga/massa dos ligantes e esta propriedade tem sido utilizada desde os anos 50 para a determinação de configuração de carboidratos (BOESEKEN, 1949; FOSTER & STACEY, 1955). Tampões em alto pH contendo ânions borato têm sido extensivamente utilizados em EC para a separação de açúcares, não somente por induzir a formação de complexos carregados e móveis a partir de carboidratos não carregados, mas também por aumentar a seletividade de separação para os carregados. Sendo os equilíbrios 2 e 3 dinâmicos, todos os carboidratos com configuração favorável vão estar associados aos ânions tetraidroxiborato em algum grau (van DUIN *et al.*, 1985, HOFFSTETTER-KUHN *et al.*, 1991; SCHIMITT-KOPPLIN *et al.*, 1998; KARIYA *et al.*, 2003)

Observando os efeitos do aumento do pH e da concentração de borato (**Figura 53**), bem como a ordem de migração dos dissacarídeos alditóis sulfatados, foi proposto um mecanismo de separação baseado no incremento de suas cargas negativas pela complexação com borato. Este mecanismo foi baseado no fato que a mobilidade de analitos negativamente carregados, em tampões de alto pH, é a resultante do FEO (em direção ao cátodo) e da migração eletroforética do analito em direção ao ânodo. O FEO é mais significativo que a migração eletroforética nestas condições, conseqüentemente, a migração resultante do analito é em direção ao cátodo (ALTRIA, 1996). Nos experimentos realizados, a separação foi provida pelas diferenças de retardamento provocado pela migração eletroforética contra o FEO. Este retardamento, por sua vez, foi gerado pela própria carga negativa dos dissacarídeos e por suas possibilidades em formar complexos com os ânions borato. A magnitude da carga negativa neste tipo de complexo é determinada por sua posição no equilíbrio, e portanto, por sua estabilidade. Dada uma quantidade constante de carboidrato, a concentração do complexo aumenta com a quantidade de ânions borato, de acordo com a lei de ação das massas, assim como com o aumento do pH. Portanto, a migração eletroforética aumenta no mesmo sentido (HOFFSTETTER-KUHN *et al.*, 1991).



O esquema apresentado na **Figura 59** correlaciona o aumento do tempo de retenção apresentado pelos dissacarídeos monossulfatados de acordo com a viabilidade de suas hidroxilas *cis*-vicinais e alditóis.

**Figura 59:** Correlação entre o aumento dos tempos de retenção dos dissacarídeos alditóis e viabilidade de suas hidroxilas *cis*-vicinais e alditóis; as setas indicam as hidroxilas favoráveis a complexação com borato.



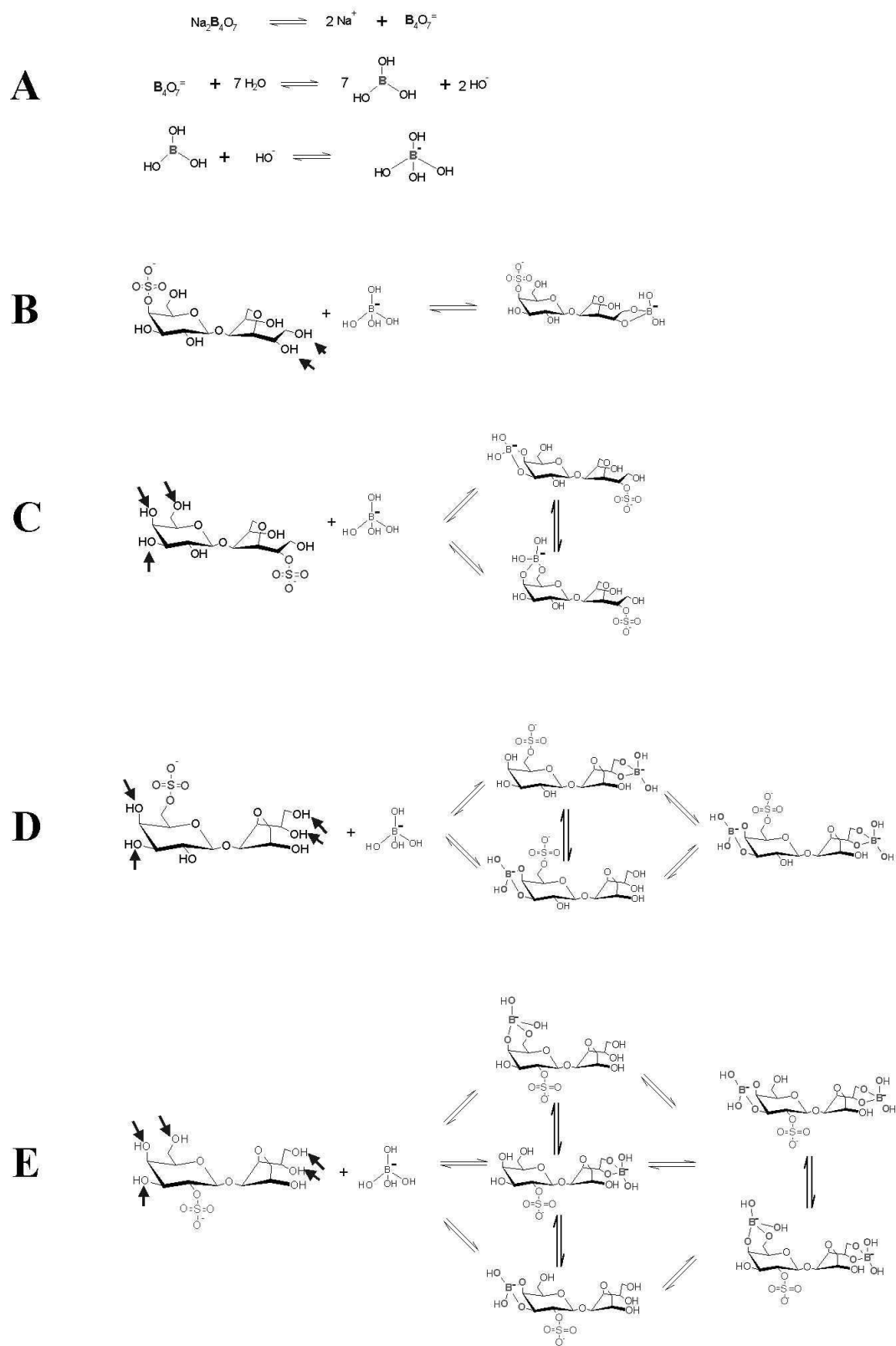
Para um melhor entendimento do mecanismo de separação dos dissacarídeos alditóis, pode-se explicar este processo através dos monocomplexos 1:1 ( $BL^-$ ) dissacarídeo-borato mais prováveis (**Figura 60**):

- carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato: apresenta o grupo sulfato na posição 4 do anel galactopiranosídico. Assim, não possui hidroxilas *cis*-vicinais passíveis de complexação com os ânions tetrahidroxiborato. As hidroxilas 1 e 2 (posições 1/2) da unidade de 3,6-AnGalOH, formam o único sítio favorável para formação do complexo (**Figura 60 B**).
- carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato: não forma complexo nas hidroxilas da porção alditol devido a presença do grupo sulfato no C-2 da unidade de 3,6-AnGalOH. Entretanto possui duas possibilidades de formação de complexo nas hidroxilas *cis* da unidade de  $\beta$ -D-Galp (complexo nas

posições 3/4 ou 4/6). Deste modo, através de comparação com seu isômero 4-sulfatado, a estrutura em questão apresenta uma possibilidade a mais de formação do complexo com os ânions tetrahidroxiborato. Sabendo que complexos borato-carboidratos apresentam um caráter de carga negativa, o carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato apresentará um incremento em sua carga negativa quando comparado ao carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato; e por isso terá um tempo de retenção maior (**Figura 60 C**).

- agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato: o grupo sulfato em C-6 da unidade de  $\beta$ -D-Galp impede a formação do complexo nas posições 4/6. O complexo poderá ser formado na região alditol (posições 1/2 da unidade de 3,6-AnGalOH) e nas posições 3/4 da unidade de  $\beta$ -D-Galp. Desta forma, esta estrutura também apresentara duas possibilidades de formação de complexo. Entretanto o agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato tem a possibilidade de formar dois complexos simultaneamente; já o mesmo não acontece com o carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato que compartilha a posição 4 da unidade de  $\beta$ -D-Galp para formar seus possíveis complexos. Assim o agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato apresenta um caráter mais negativo que os dois carrabiitois, uma vez que apresenta três possíveis formas de complexação – 1/2 ou 3/4 ou simultaneamente 1/2 e 3/4 (**Figura 60 D**).
- agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato: o grupo sulfato em C-2 não bloqueia posições passíveis de complexação. Esta espécie apresenta três possibilidades de complexos – 3/4 ou 4/6 ou 1/2; e duas possibilidades de complexos simultâneos – 3/4 e 1/2 ou 4/6 e 1/2. Desta forma, o agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato apresenta-se como o dissacarídeo alditol mais negativamente carregado nas condições de tampão utilizadas (**Figura 60 E**).

**Figura 60:** Equilíbrio químico dos monocomplexos 1:1 (BL<sup>-</sup>) tetrahidroxiborato-dissacarídeos alditóis mais prováveis.



Para os tetrassacarídeos carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato e carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato, a ordem de saída do capilar é compatível com seus análogos dissacarídicos (carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato). Estes apresentam um tempo de retenção maior que os dissacarídeos devido a menor relação *m/z* apresentada por ambos.

van den Berg e colaboradores (1994) estudaram a formação de complexos de borato a partir de vários mono- e dissacarídeos em solução aquosa em pH 7 através de RMN de <sup>11</sup>B e <sup>13</sup>C. As constantes de associação ( $K_{loc} = [BL^-] / [B^-][L]$ ) foram determinadas para alguns galactopiranosídeos e os valores para os complexos em 3/4 e 4/6 foram ~13 e ~5, respectivamente. Os complexos BL<sub>2</sub><sup>-</sup> em 3/4 também foram detectados com uma constante de associação de ~10. Estes dados sugerem que os complexos 3/4 têm uma participação mais importante que 4/6 na formação de complexos borato-galctopiranosídeos. Entretanto, nos experimentos realizados, o complexo 4/6 parece ser o fator determinante, principalmente na separação dos dissacarídeos agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato e agarobiitol-6<sup>2</sup>-sulfato. Isto pode ser explicado por mudanças no equilíbrio devido a repulsão de Coulumb (van DUIN *et al.*, 1985, HOFFSTETTER-KUHN *et al.*, 1991) entre o borato e o grupo O-6 sulfato no agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (desestabilização do complexo 3/4).

Dados na literatura mostram que alditóis formam complexos com borato que são muito mais estáveis que com os formados em anéis piranosil (DAVIS & MOTT, 1980). Observando os tempos de retenção bastante próximos apresentados por carrabiitol-2<sup>1</sup>-sulfato e carrabiitol-4<sup>2</sup>-sulfato ( $R_{KA/TA} = 1,2$ ), pode-se concluir que a complexação nas posições 1/2 da unidade 3,6-AnGalOH teve alguma participação nos experimento de EC. Entretanto, pode-se especular que o complexo proposto é menos estável que um complexo não ciclizado alditol-borato devido a interferência do anel 3,6-anidro. Em adição, de acordo com a literatura, dióis em posições terminais não são estáveis com dióis-*threo* internos em alditóis (van DUIN *et al.*, 1985, SCHIMITT-KOPPLIN *et al.*, 1998).

Outros fatores podem influenciar a separação baseada na formação de complexos de borato dos oligossacarídeos alditóis aqui descritos, como por

exemplo: (a) eletrólitos, além do borato, os quais compõem o tampão utilizado podem ter influenciado a separação; (b) soluções aquosas de borato não contêm somente ânions tetraidroxiborato, mas também poliânions condensados, tais como,  $[B_3O_3(OH)_5]^{2-}$  e  $[B_4O_5(OH)_4]^{2-}$  (tetraborato); (c) *trans*-1,2-dióis e grupos hidroxilas ligados em carbonos alternados podem estar envolvidos nestas complexações em algum grau (van DUIN *et al.*, 1985). Entretanto, os esquemas apresentados nas **Figuras 59 e 60** são modos simplificados e compreensíveis para o entendimento da separação eletroforética mostrada neste trabalho.

#### 4.5.1. Análise de curvas de hidrólise por EC.

Com o estabelecimento do método eletroforético, foi testada a possibilidade de realizar o acompanhamento do processo hidrolítico dos polissacarídeos de *Kappaphycus alvarezii* (*kappa*-carragenana) através da análise de alíquotas coletadas em diferentes tempos da hidrólise redutiva parcial.

Para este experimento foi realizado o seguinte procedimento: primeiramente foi preparada uma solução para realização da hidrólise redutiva parcial de uma *kappa*-carragenana, de acordo com o método estabelecido por USOV e ELASHVILI (1991). A mistura foi então incubada a 60°C, sendo retirada uma alíquota antes da incubação. Outras alíquotas foram então seqüencialmente retiradas em intervalos de 1 h, a partir de duas horas de hidrólise. Desta forma, foram retiradas alíquotas nos tempos de 0 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h e 8 h.

Cada alíquota foi submetida a uma seqüência de purificação (**Figura 61 A**), com o intuito de diminuir os subprodutos da hidrólise:

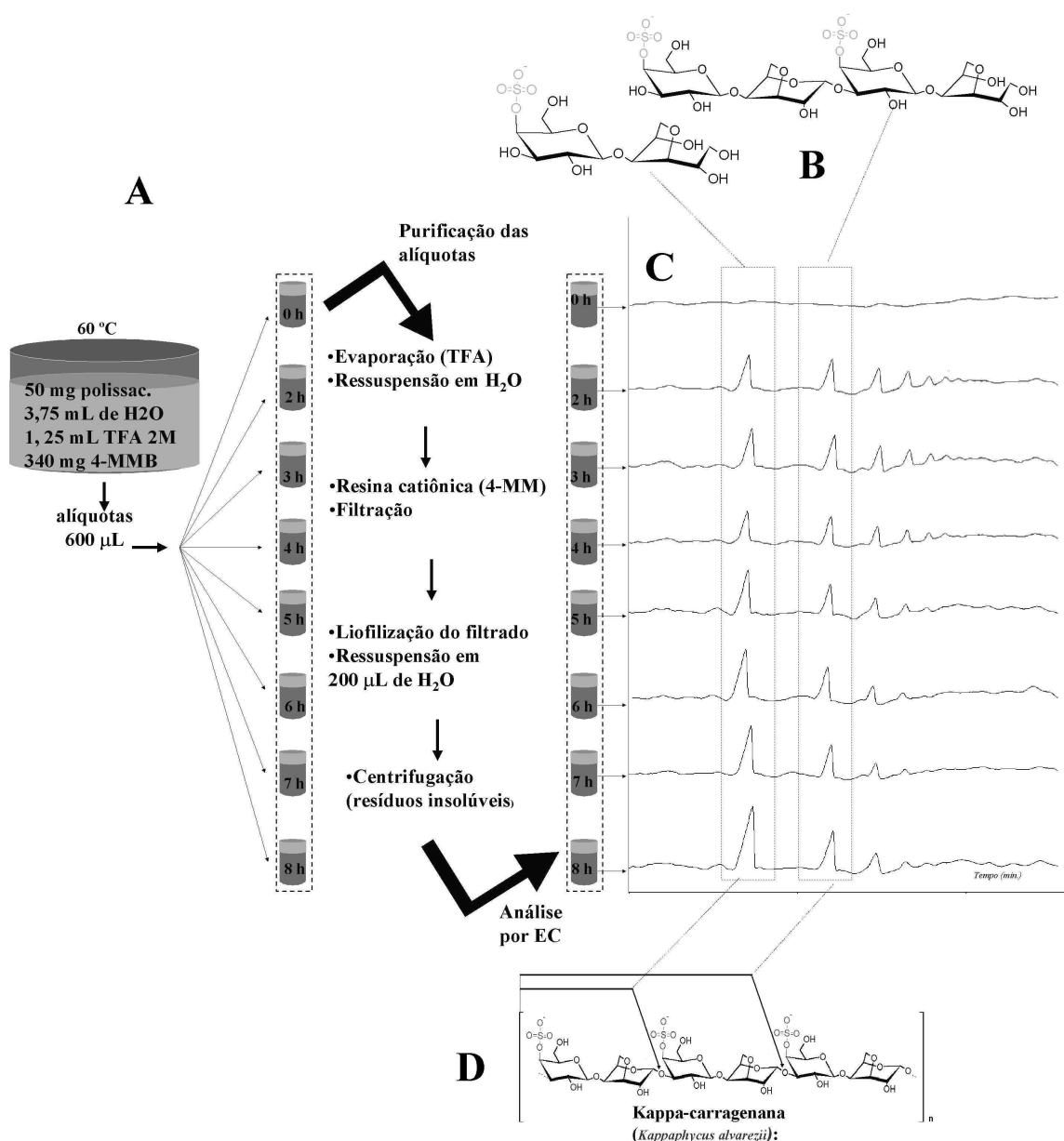
- Eliminação do TFA: o TFA (volátil) é eliminado por evaporação das alíquotas para encerrar definitivamente a hidrólise.
- Eliminação do 4-MMB: o resíduo de evaporação é ressuspenso em água e aplicado a uma resina catiônica (forma  $H^+$ ). A metilmorfolina (subproduto do 4-MMB) é uma amina terciária e, desta forma, se apresentará protonada em solução aquosa em praticamente todas as

faixas de pH. Assim, a metilmorfolina protonada se liga à resina catiônica, enquanto os oligossacarídeos são eluídos livremente.

- Remoção dos resíduos insolúveis: o eluato da resina catiônica é liofilizado, ressuspenso em água e submetido à centrifugação para remoção dos resíduos insolúveis. Estes resíduos podem levar ao entupimento do capilar, desta forma faz-se uma filtração em membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  para garantir a ausência de partículas insolúveis na solução.
- A partir daí, as alíquotas purificadas são submetidas à análise por EC, de acordo com o método estabelecido (**Figura 61 C**).

Mesmo tendo somente carrabitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carratetraitol-4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato como padrões para a análise do hidrolisado da *kappa*-carragenana, foi possível deduzir a estrutura química dos outros oligossacarídeos detectados. Isto porque o polissacarídeo usado como material de partida para hidrólise é uma *kappa*-carragenana pura, sendo constituída por díades repetitivas de [ $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)] por toda extensão da cadeia polimérica. Deste modo, a hidrólise redutiva parcial (que somente cliva as ligações 3,6-anidrogactosídicas) vai gerar somente oligossacarídeos alditóis de número de unidades par, com uma unidade de 3,6-anidrogactitol como terminal. Primeiramente determinou-se, por tempo de retenção, os picos correspondentes aos oligossacarídeos padrões (di- e tetrassacarídeo) nos eletroferogramas da curva de hidrólise. Depois é possível concluir que os picos subseqüentes correspondem aos hexa-, octa-, decassacarídeos, sempre aumentando a cadeia oligossacarídica por inserção de unidades dissacarídicas (**Figura 61 B e D**). A análise eletroforética das alíquotas coletadas durante a hidrólise (**Figura 61 C**) mostrou a presença de oligossacarídeos com até quatorze unidades monossacarídicas.

**Figura 61:** Esquema da curva de hidrólise reductiva parcial da *kappa*-carragenana através de EC. (A) hidrólise, divisão em alíquotas e purificação. (B) padrões utilizados para a análise dos eletroferogramas da curva de hidrólise (carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato e carratetraitol-4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato). (C) eletroferogramas correspondentes aos tempos de hidrólise. (D) Estrutura da *kappa*-carragenana e indicação dos pontos de hidrólise para formação de oligossacarídeos de vários graus de polimerização.

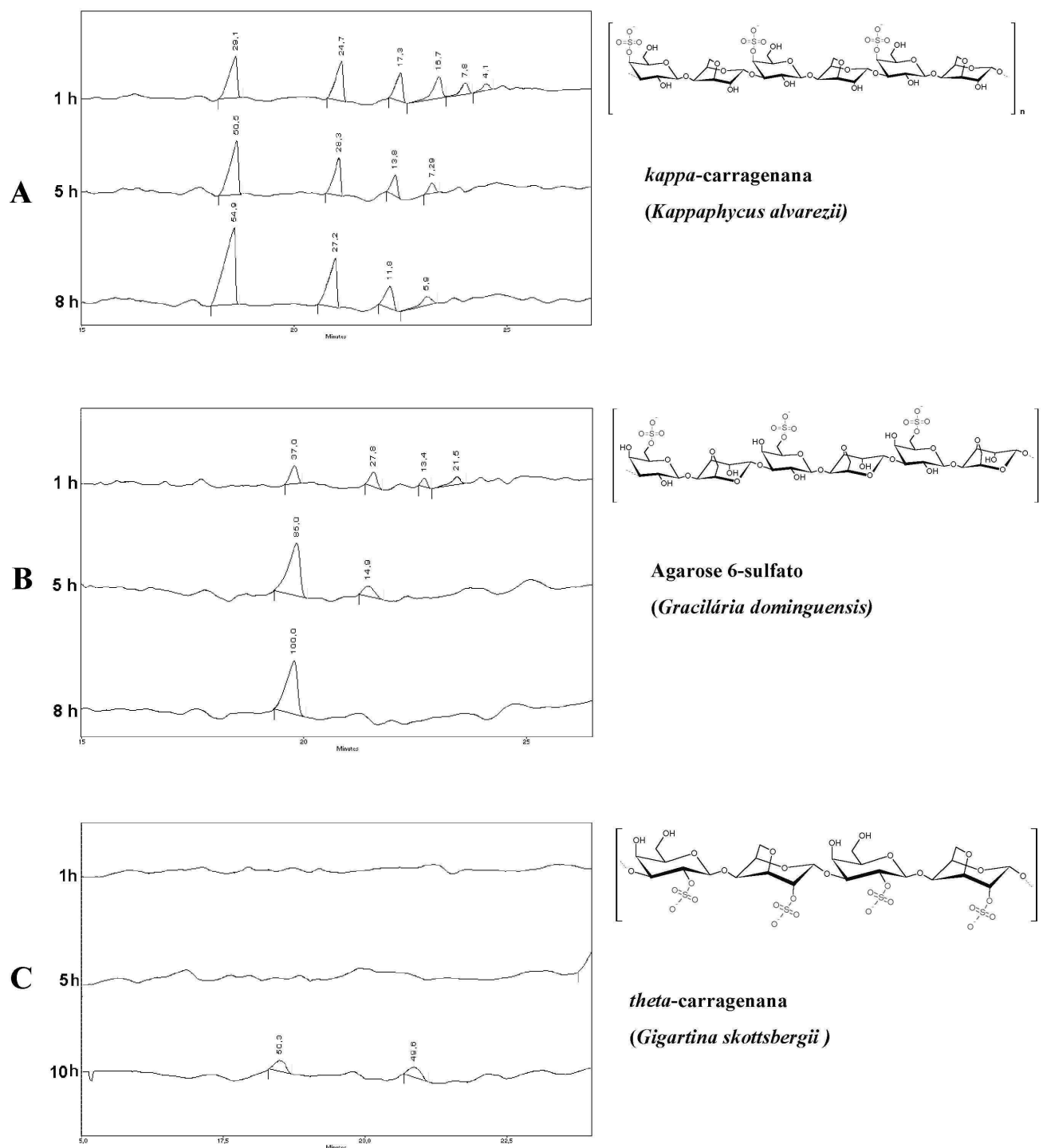


Através do monitoramento do processo hidrolítico, foi possível encontrar tempos de hidrólise ideais para a obtenção de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização.

Deste modo, com o sucesso do experimento de determinação de curvas de hidrólise por EC, foi realizado o mesmo procedimento para mais dois modelos polissacarídicos: agarose 6-sulfato (*Gracilaria domingensis*) e uma *theta*-carragenana (*Gigartina skottsbergii*). A partir dos eletroferogramas apresentados na **Figura 62**, pode-se observar os graus de hidrólise num mesmo tempo, foram diferentes para os polissacarídeos analisados.



**Figura 62:** Eletroferogramas correspondentes a alguns tempos de hidrólise reductiva parcial de 3 diferentes polissacarídeos: (A) *kappa*-carragenana; (B) agarose 6-sulfato e (C) *theta*-carragenana.



A agarana 6-sulfatada foi o polissacarídeo que sofreu hidrólise mais rápida; em 8 h de hidrólise, todo polissacarídeo já havia sido convertido à dissacarídeos. A *kappa*-carragenana já apresentava oligossacarídeos de poucas unidades (duas e quatro) no tempo de uma hora, mas em proporção bem menor que àquela da agarana 6-sulfatada e, no tempo de 8 h, ainda haviam oligossacarídeos de seis e oito unidades em proporção considerável na solução hidrolítica. A *theta*-carragena foi o polissacarídeo que apresentou maior resistência à hidrólise redutiva parcial; somente no tempo de 10 horas começaram a ser detectados os primeiros oligossacarídeos formados.

Da análise desses resultados, infere-se que a posição do grupo sulfato no polissacarídeo interfere na ação hidrolítica, sendo que, quanto mais próximo este grupo estiver da ligação glicosídica, mais difícil é a ação hidrolítica e mais tempo levará para que a ligação seja rompida, sendo necessário o prolongamento do tempo de hidrólise. Estas observações são consistentes com as conclusões alcançadas durante o processo de obtenção dos oligossacarídeos (ítem 4.2.5.).

A combinação da eletroforese capilar juntamente com a estratégia de detecção permitiu a obtenção de eletroferogramas de alta resolução para estruturas muito similares. Além disto, o processo de preparo de alíquotas proveniente de diferentes tempos de HRP, proporcionou o monitoramento da formação dos oligossacarídeos alditóis para diferentes modelos polissacarídicos. Desse modo, as condições desenvolvidas neste trabalho podem ser uma ferramenta eficiente para obtenção de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e para o estudo de galactanas de algas marinhas com padrão de sulfatação mais heterogêneo.

## 4.6. DERIVAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS

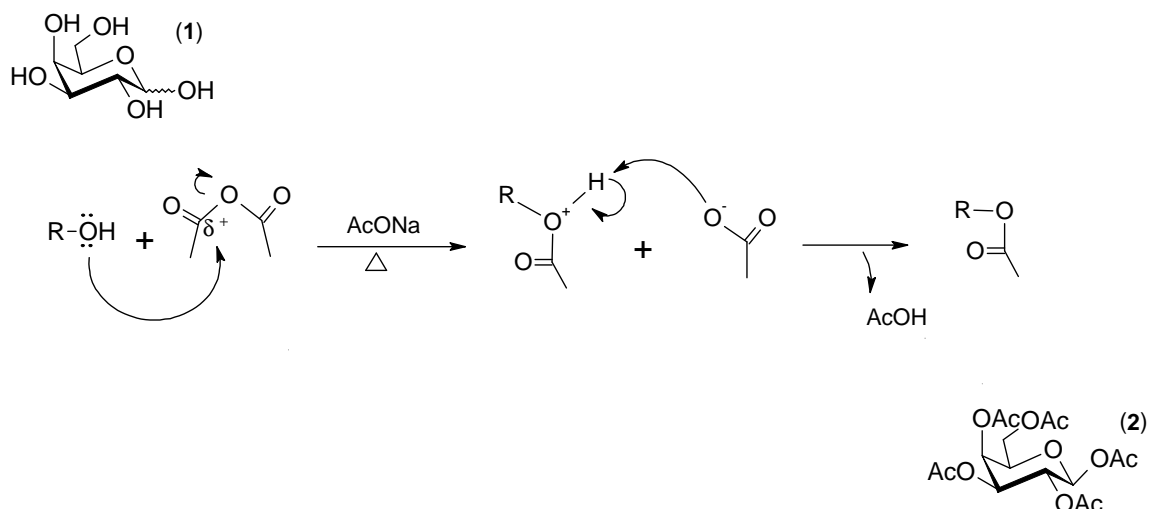
### 4.6.1. Modificações químicas em metil galactopiranosídeos.

A produção de oligossacarídeos alditóis derivados de galactanas de algas marinhas realizada em nossos experimentos prévios alcançou escalas de dezenas de miligramas o que seria suficiente para a produção dos alquilglicosídeos de interesse. Entretanto, para o estabelecimento das condições ideais de reação foram utilizados alguns metilgalactosídeos sintéticos. Essa estratégia foi determinada devido a similaridade do Me  $\beta$ -D-Galp (**5**) com pelo menos parte da estrutura dos oligossacarídeos a serem derivatizados. Ainda, os metilgalactosídeos utilizados como modelos no desenvolvimento das reações de alquilação puderam ser sintetizados na escala de gramas, o que possibilitou o estudo de um grande número de diferentes condições de reação.

#### 4.6.1.1. Síntese do Me $\beta$ -D-Galp.

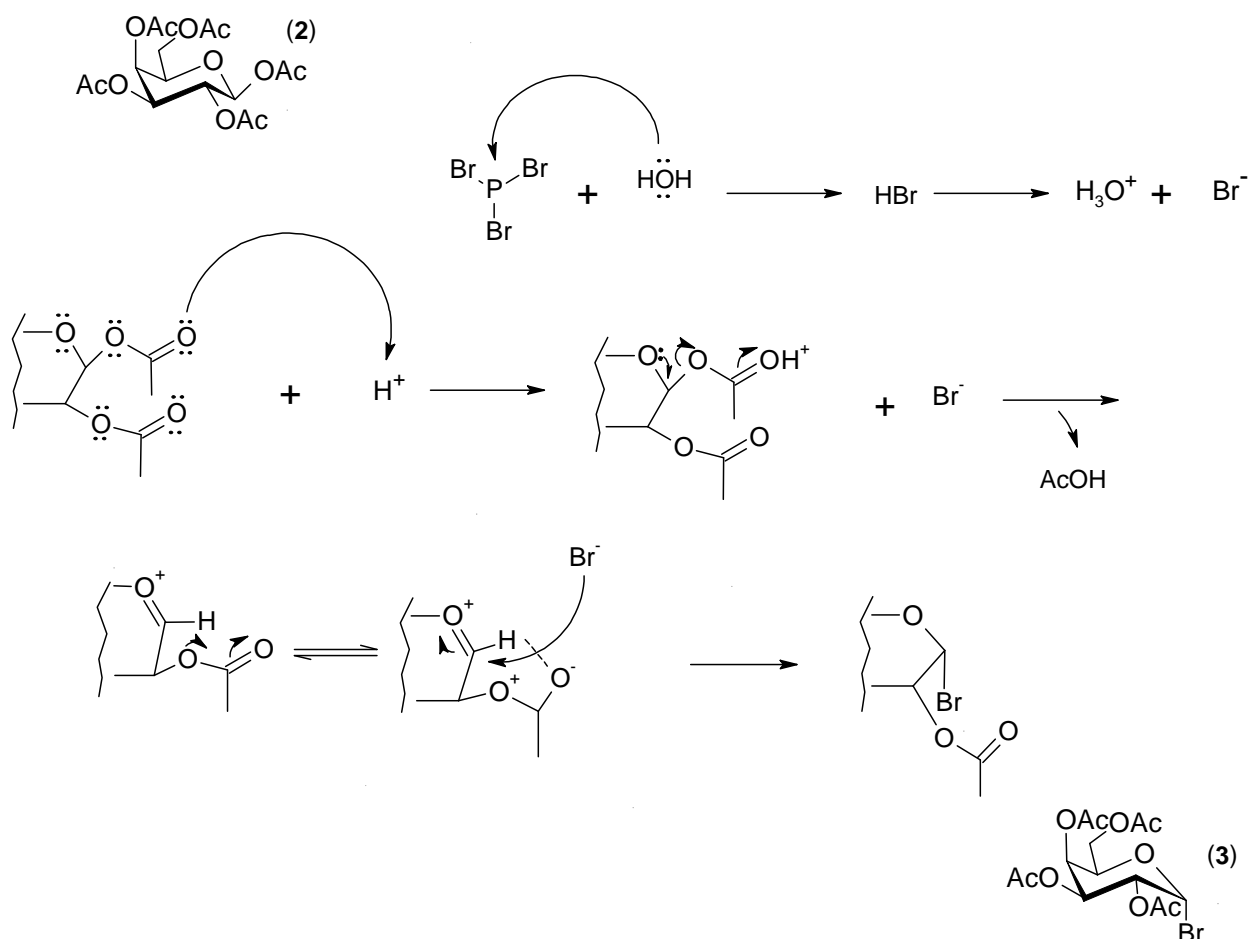
O composto **5** (Me  $\beta$ -D-Galp) foi sintetizado em quatro etapas a partir da D-galactose (**1**). O primeiro passo consistiu na peracetilação da galactose com anidrido acético na presença de acetato de sódio em alta temperatura. Com estas condições, onde a formação do anômero  $\beta$  é altamente favorecida, foi produzido  $\beta$ -D-Galp pentaacetato (composto **2** – **Figura 63**), que após recristalização apresentou rendimentos satisfatórios (65%) em acordo com a literatura (WOLFROM & THOMPSON, 1963).

**Figura 63:** Formação do  $\beta$ -D-Galp pentaacetato (**2**) a partir da D-galactose (**1**).



O próximo passo consistiu na síntese do doador glicosil, 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-bromo- $\alpha$ -D-Galp (**3**). Esta reação é classicamente feita através do método de BÁRCZAI-MARTOS & KÖRÖSY (1950) que emprega o uso direto de ácido bromídrico em ácido acético glacial. Entretanto foi utilizada uma metodologia alternativa (e mais simples) desenvolvida no laboratório onde este trabalho foi realizado (resultados não publicados). Esta reação consiste no uso de tribrometo de fósforo em diclorometano na presença de água. Nestas condições, o ácido bromídrico é formado *in situ*, devido à reação do tribrometo de fósforo com a água (**Figura 64**). O doador glicosil (**3**) foi obtido com um rendimento de 77% na forma de um xarope amarelo pálido.

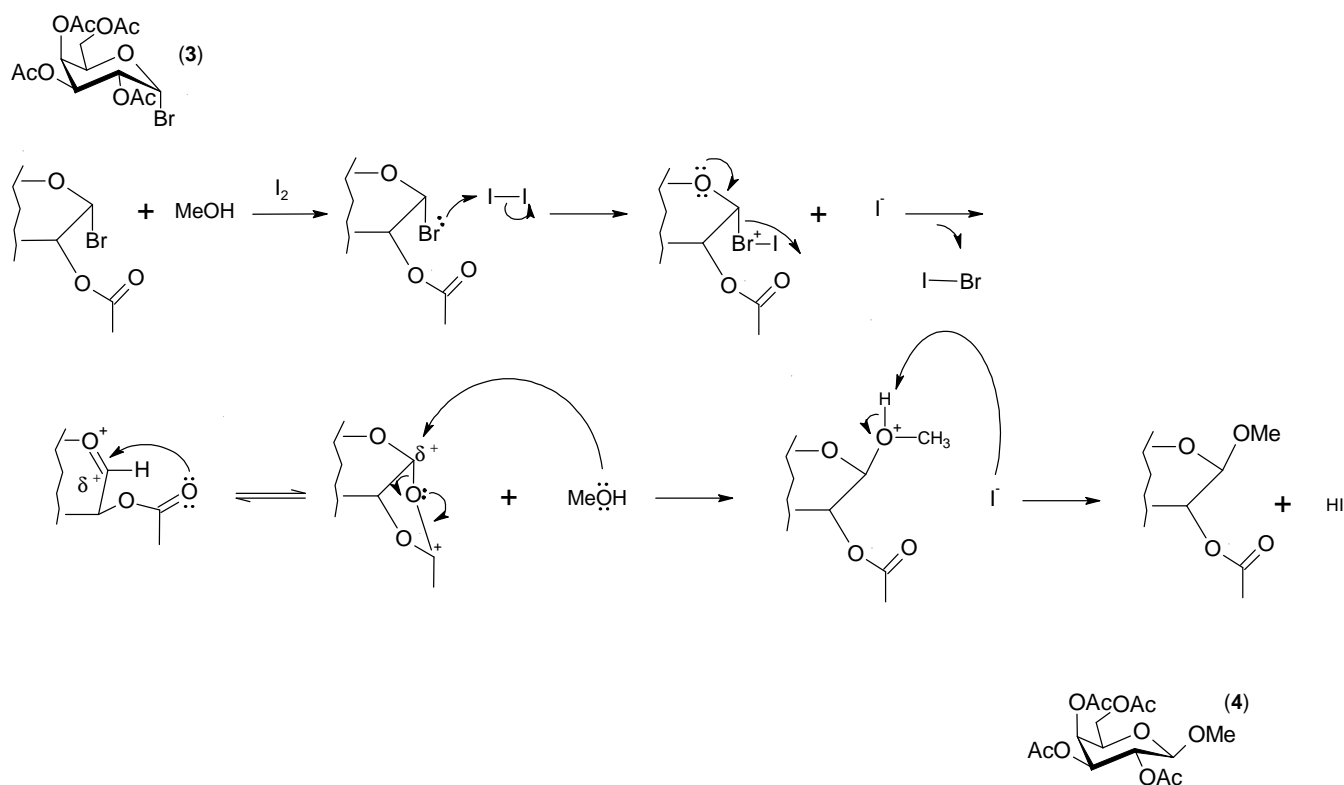
**Figura 64:** Formação do 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-bromo- $\alpha$ -D-Galp (**3**) a partir do  $\beta$ -D-Galp pentaacetato (**2**).



O composto **3** foi então submetido à metanólise na presença de quantidades estequiométricas de iodo e com adição de peneira molecular de 4A<sup>o</sup>. Este processo é exotérmico sendo os reagentes adicionados em banho de gelo para evitar a degradação do doador glicosil. Segundo a literatura (KARTHA *et al.*, 1996), o  $\beta$ -galactopirásídeo produto desta reação geralmente é obtido em rendimentos próximos a 100%. Neste trabalho, o rendimento alcançado na

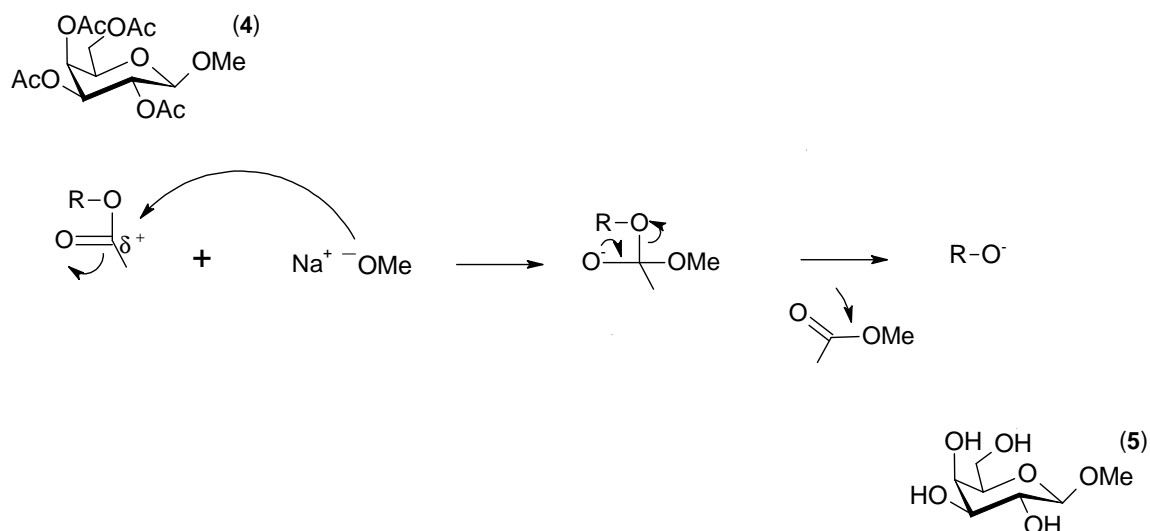
preparação do composto **4** foi de 82%, provavelmente devido a perdas durante o processamento da mistura reacional para a obtenção do produto puro. O mecanismo preciso desta reação ainda não é compreendido, mas é concebível que o iodo aja como um halófilo, resultando na formação do íon iodobromônio, seguido de fragmentação para formar I-Br e um íon oxocarbônio derivado do carboidrato (**Figura 65**).

**Figura 65:** Formação do Me 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-Galp (**4**) a partir do 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-bromo- $\alpha$ -D-Galp (**3**).



Como último passo para a obtenção do Me  $\beta$ -D-Galp (5), o composto 4 foi submetido à deacetilação na presença de metóxido de sódio em metanol a temperatura ambiente (**Figura 66**). Após recristalização, o produto foi obtido com um rendimento de 73% apresentando constantes físicas compatíveis com as descritas na literatura para o produto desejado (THOMPSON & WOLFROM, 1963).

**Figura 66:** Formação do Me  $\beta$ -D-Galp (5) a partir do Me 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-Galp (4).



#### 4.6.2. Grupos de bloqueio para OH-6 do Me $\beta$ -D-Galp (5).

Os oligossacarídeos alditóis submetidos às reações de alquilação apresentavam, na maioria dos casos, dois sítios passíveis de alquilação pela metodologia de intermediários de acetais de dibutilestanileno: OH-3 da unidade de  $\beta$ -D-Galp (hidroxila secundária) e OH-1 da unidade da unidade de An-3,6-GalOH (hidroxila primária). Neste caso, o estudo de grupos de bloqueio seletivo de hidroxilas primárias poderia ser útil na etapa posterior do trabalho desenvolvido, já envolvendo os oligossacarídeos alditóis em questão. Assim, alguns derivados contendo grupos comumente utilizados para bloqueio de hidroxilas primárias foram preparados a partir do composto **5**.

Os três grupos de bloqueio testados (*tert*-butilsilil, tritol, tosil) foram preparados de maneira semelhantes através do uso de cloretos dos grupos utilizados em piridina.

Na reação de tosilação, a adição dos reagentes foi realizada a  $-41^{\circ}\text{C}$  sendo a mistura mantida em freezer devido à alta reatividade do cloreto de tosil frente às hidroxilas do galactosídeo (KOOS & GAJDOS, 1997). Temperaturas baixas direcionam a regiosseletividade da reação para OH-6 aumentando os rendimentos significativamente para o produto monossustituído na referida posição. O rendimento (50%) moderado alcançado foi provocado pelo método de purificação escolhido que se resumiu à cromatografia direta do resíduo originado da evaporação do meio reacional. A fim de se obter um produto com alto grau de pureza, passos adicionais de cromatografia foram necessários.

A reação com o cloreto de *tert*-butilsilil (COREY & VENKATESWARLU, 1972) foi realizada à temperatura ambiente, uma vez que a reatividade deste grupo é menor em comparação ao grupo tosil. Após o tempo de reação, o meio reacional foi tratado com HCl 1 M e depois submetido a extrações clorofórmicas. O resíduo de evaporação dos extratos combinados foi cromatografado gerando o produto altamente puro em um rendimento de 83%.

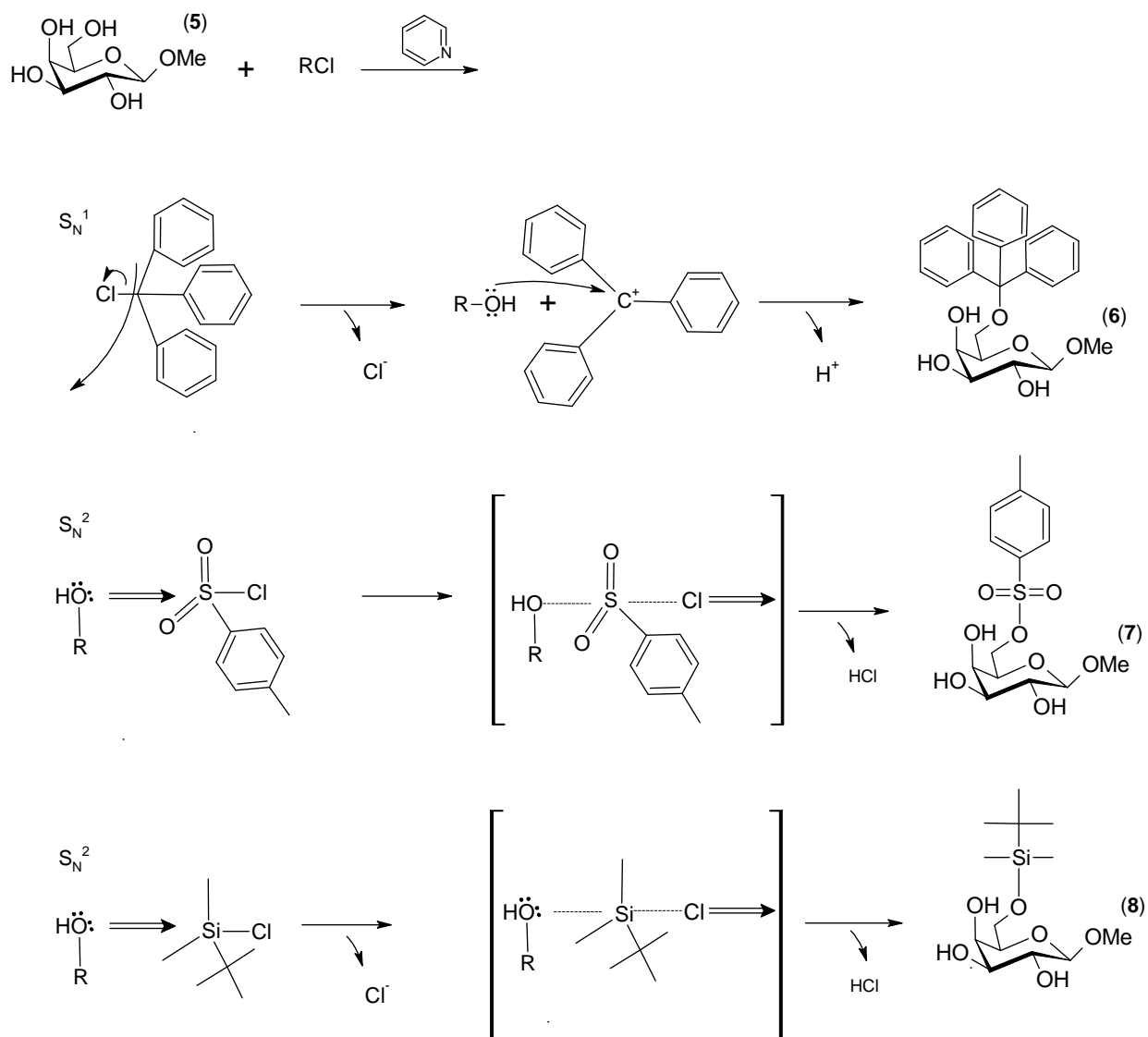
A reação de tritilação foi também conduzida a temperatura ambiente, entretanto o meio reacional não pode ser tratado com HCl 1 M (o que torna a



remoção da piridina mais eficiente) devido à fragilidade do grupo tritil frente a ácidos. O tratamento do meio reacional resumiu-se a adição de água destilada, extrações com clorofórmio e seguido de cromatografia, alcançando-se um rendimento de 75%.

Devido ao tipo de reação e aos reagentes utilizados, estas reações, em teoria, forneceriam rendimentos próximos a 100%. Com os resultados obtidos fica claro que o tipo de processamento realizado após o tempo de reação é determinante para a obtenção de bons rendimentos. A **Figura 67** mostra o mecanismo esperado para as reações de tritilação, tosilação e *tert*-butilsililação para a formação dos compostos Me 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp (**6**); Me 6-O-tosil- $\beta$ -D-Galp e (**7**) Metil 6-O-*tert*-butildimetilsilil- $\beta$ -D-Galp (**8**).

**Figura 67:** Formação dos compostos Me 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp (6); Me 6-O-tosil- $\beta$ -D-Galp e (7) Metil 6-O-*tert*-butildimetilsilil- $\beta$ -D-Galp (8) a partir do Me  $\beta$ -D-Galp (5).



#### 4.6.3. Alquilação regioseletiva dos metilgalactosídeos via acetais dibutilestanileno

Os acetais de dibutilestanileno foram formados através de refluxo dos metilgalactosídeos com óxido de dibutilestanho ( $\text{Bu}_2\text{SnO}$ ) em metanol “seco” por três horas e remoção do metanol e traços de água por destilação azeotrópica com tolueno por duas horas. Várias condições para as reações de alquilação dos acetais de dibutilestanileno do composto **5** e seus derivados foram investigadas, como listado na **Tabela 8**. Em todos os casos, o uso de um equivalente de  $\text{Bu}_2\text{SnO}$  (em relação a quantidade em mol do galactopiranosídeo) resultou na formação preferencial do derivado 3-O-alkil com quantidades variáveis do derivado 3,6-di-O-alkil. Os resultados obtidos também mostram que as condições estabelecidas por DANISHEFSKI & HUNGATE (1986) e NAGASHIMA & OHNO (1987) (reação em DMF com adição de fluoreto de cério), conduz a melhores resultados que as primeiras condições desenvolvidas para estas reações por ALAIS e colaboradores (1983), as quais envolvem reação em benzeno ou tolueno com adição de haletos de tetralquil amônio (na **Tabela 8** comparar entradas 1 e 2 com 11, 13 ou 15). Reações conduzidas em temperaturas moderadas com tempos de reação mais longos (65 °C e 48 h) proporcionaram melhores rendimentos que tempos mais curtos e temperaturas elevadas (na **Tabela 8** comparar entradas 4-8 com 11).

A formação de acetais *bis*(dibutilestanileno), através da reação com dois equivalentes de óxido de dibutilestanho seguido de reação com excesso de haleto de alkila e tempos mais prolongados, aumentou a quantidade de produto 3,6-di-O-alkil obtido para até 50%. A facilidade de formação do produto 3,6-di-O-alkil é inversamente proporcional ao aumento da cadeia alquílica (entradas 12, 14 e 16). Expressando-se em percentagem de mistura de produtos, o máximo de produto dialquilado foi 25%, 44% e 53% para os brometos de tetradecila, dodecila e decila, respectivamente. Isto indica que a cadeia alkila ocupa espaço suficiente para interferir com a segunda alquilação. Somente o acetal de dibutilestanileno do

composto 3-O-tetradecil purificado (**5b**) foi submetido a reação frente ao brometo de alquila chegando-se a um rendimento insatisfatório (entrada 19).

Comparando as entradas 8, 9 e 10 fica claro que a melhor opção entre as testadas de bloqueio OH-6 é através do uso do grupo tritil. Os grupamentos tosil e *tert*-butildimetilsilil apresentaram-se instáveis nas condições estabelecidas. A **Figura 68** mostra a reação geral dos compostos obtidos e suas estruturas.

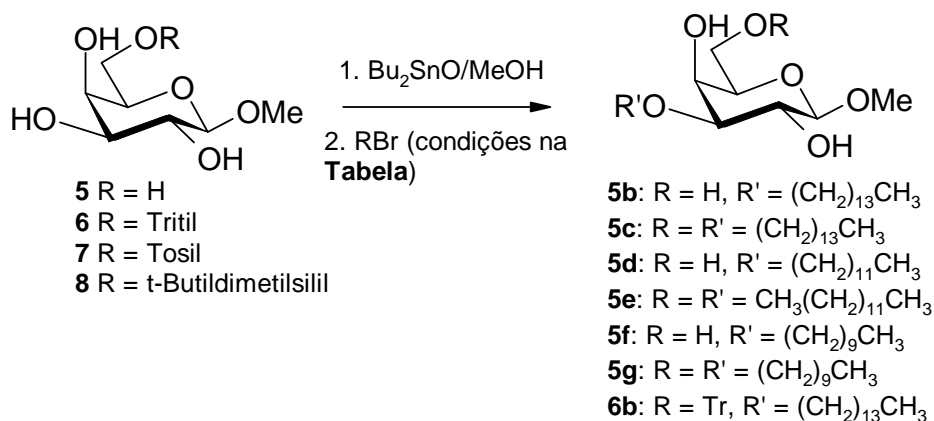
**Tabela 8:** Di- e monoalquilações dos metil  $\beta$ -galactosídeos via acetais de dibutilestanileno

Entr.	Substrat.	Eq. de Bu <sub>2</sub> SnO	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CH <sub>3</sub> (eq)	Ad. nucleófilo (eq) <sup>a</sup>	Temp.	Tempo	Produto (rend. %)
1	<b>5</b>	1,01	n = 13 (1,41)	TBAB (1,03)	reflux	5 h	-
2	<b>5</b>	1,2	n = 13 (3,45)	TBAB (2,00)	80 °C	16h	<b>5b</b> (37), <b>5c</b> (9)
3	<b>5</b>	1,00	n = 13 (1,00)	CsF (1,00)	rt	16 h	-
4	<b>5</b>	1,20	n = 13 (1,20)	CsF (2,50)	80 °C	16 h	<b>5b</b> (53), <b>5c</b> (8)
5	<b>5</b>	2,02	n = 13 (4,33)	CsF (4,07)	80 °C	16 h	<b>5b</b> (45), <b>5c</b> (16)
6	<b>5</b>	1,10	n = 13 (2,40)	CsF (2,07)	140 °C	16 h	<b>5b</b> (25), <b>5c</b> (5)
7	<b>5</b>	1,02	n = 13 (4,00)	CsF (2,33)	120 °C	17 h	<b>5b</b> (25), <b>5c</b> (7)
8	<b>6</b>	1,04	n = 13 (3,38)	CsF (3,32)	80 °C	15 h	<b>6b</b> (61)
9	<b>7</b>	1,14	n = 13 (3,82)	CsF (3,02)	80 °C	16 h	-
10	<b>8</b>	1,07	n = 13 (3,23)	CsF (3,41)	80 °C	16 h	<b>5b</b> (30)
11	<b>5</b>	1,13	n = 13 (1,81)	CsF (2,66)	65 °C	48 h	<b>5b</b> (61), <b>5c</b> (3)
12	<b>5</b>	2,04	n = 13 (5,35)	CsF (2,79)	65 °C	96 h	<b>5b</b> (55), <b>5c</b> (10)
13	<b>5</b>	1,05	n = 11 (1,82)	CsF (2,61)	65 °C	48 h	<b>5d</b> (67), <b>5e</b> (7)
14	<b>5</b>	2,01	n = 11 (5,20)	CsF (5,03)	65 °C	96 h	<b>5d</b> (40), <b>5e</b> (33)
15	<b>5</b>	1,05	n = 9 (2,16)	CsF (2,53)	65 °C	48 h	<b>5f</b> (68), <b>5g</b> (6)
16	<b>5</b>	2,00	n = 9 (5,28)	CsF (2,93)	65 °C	96 h	<b>5f</b> (36), <b>5g</b> (40)
17	<b>5</b>	1,00	n = 13 (26,27)	CsF (3,19)	70 °C	72 h	<b>5b</b> (42), <b>5c</b> (10)
18	<b>5</b>	2,00	n = 13 (26,27)	CsF (3,19)	70 °C	72 h	<b>5b</b> (48), <b>5c</b> (16)
19	<b>5b</b>	1,10	n = 13 (3,52)	CsF (3,21)	65 °C	96 h	<b>5c</b> (32)
20	<b>5</b>	2,00	n = 9 (27,53)	CsF (3,19)	70 °C	72 h	<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Reações usando brometo de tetrametilamônio (TBAB) como nucleófilo adicionado foram realizadas em tolueno. Aquelas realizadas usando CsF foram realizadas em *N,N*-dimetilformamida (DMF).

<sup>b</sup> Mistura de cinco produtos diferentes.

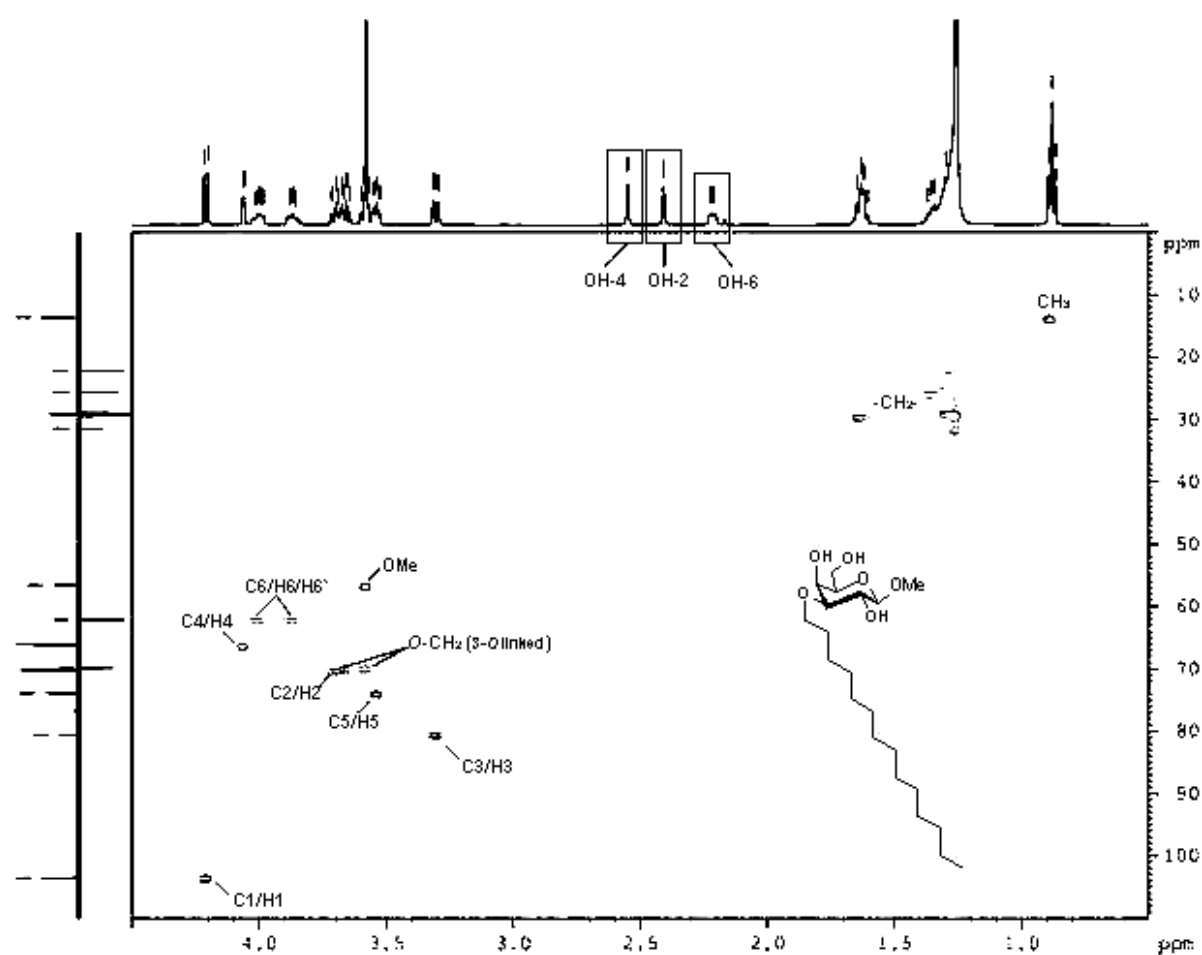
**Figura 68:** Reação geral para a obtenção dos compostos apresentados na **Tabela 8**.

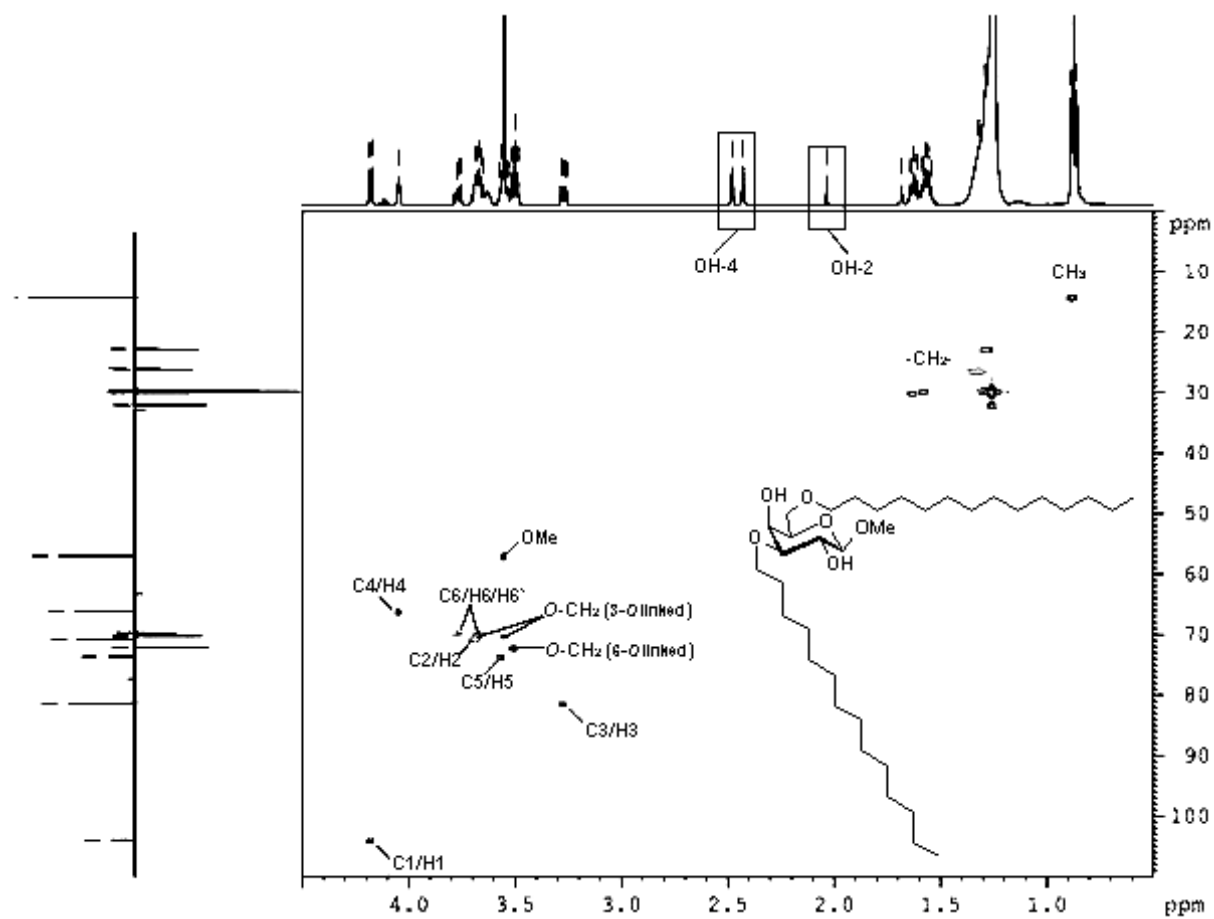


Os compostos apresentados na **Tabela 8** e **Figura 68** foram caracterizados por espectrometria de massa (ESIMS) e RMN incluindo os experimentos monodimensionais  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT, e bidimensionais  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY e  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC, HMBC. As **Figuras 69** e **70** mostram espectros de HSQC indicando as correlações referentes aos hidrogênios e carbonos dos compostos **5b** e **5c**.

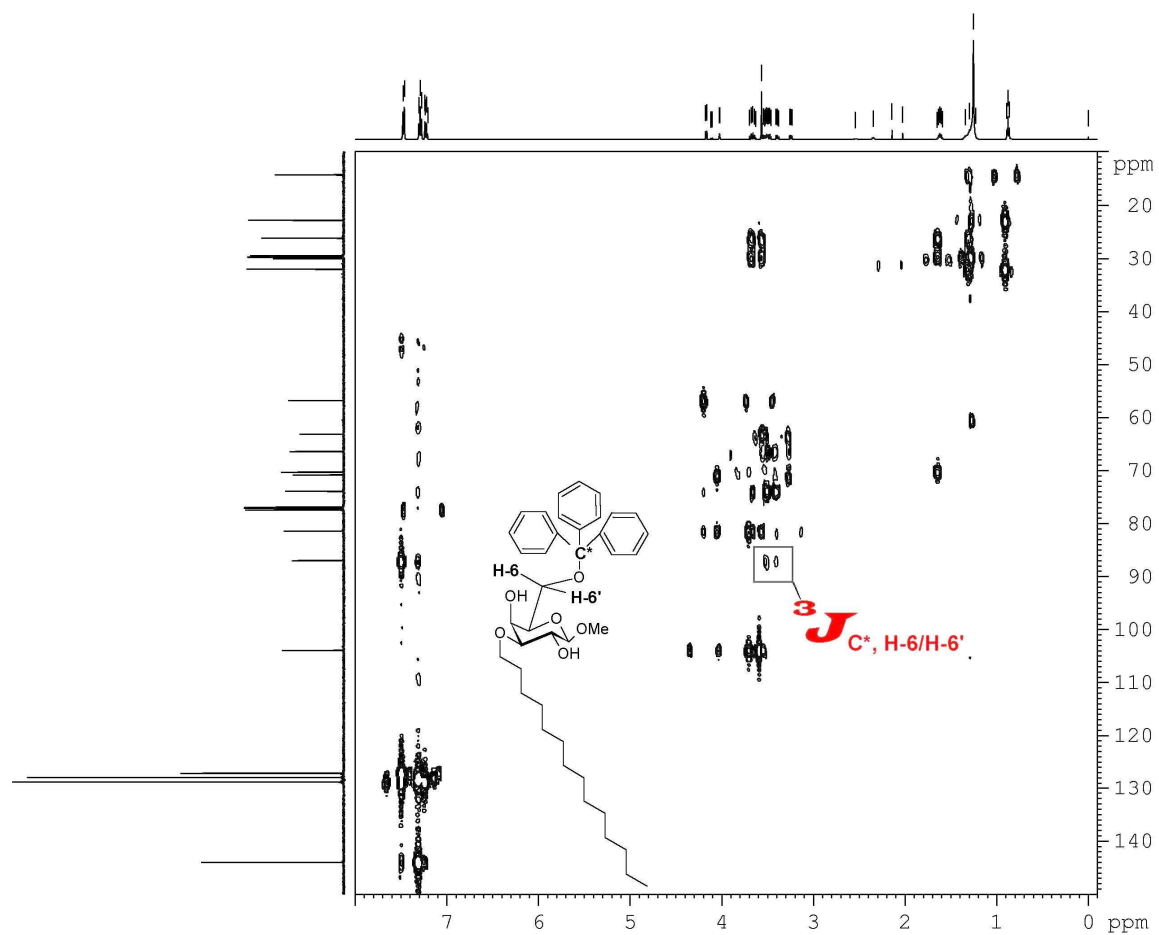
Para o assinalamento dos compostos que apresentavam o grupo tritil, os experimentos de HMBC mostraram-se essenciais, uma vez que a substituição por este grupo não gera um deslocamento químico significativo no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Este experimento foi particularmente útil para a comprovação da substituição do grupo tritil em C-6 através das correlações originadas do acoplamento de H-6 e H-6' com o carbono quaternário do grupo tritil. A **Figura 71** mostra o espectro de HMBC do composto **6b** com a indicação das correlações correspondentes a  $^3J_{\text{C}^*/\text{H}-6/\text{H}-6'}$ .

Os dados da caracterização estrutural dos compostos apresentados na **Tabela 8** (assinalamentos, espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de ESIMS), bem como suas propriedades físico-químicas, estão disponíveis no **ANEXO 1**, seguindo a numeração utilizada na **Tabela 8**.

**Figura 69:** Espectro de HSQC do composto **5b**.

**Figura 70:** Espectro de HSQC do composto **5c**.

**Figura 71:** Espectro de HMBC do composto **6b** com a indicação das correlações correspondentes a  $^3J_{C^*/H-6/H-6'}$ .

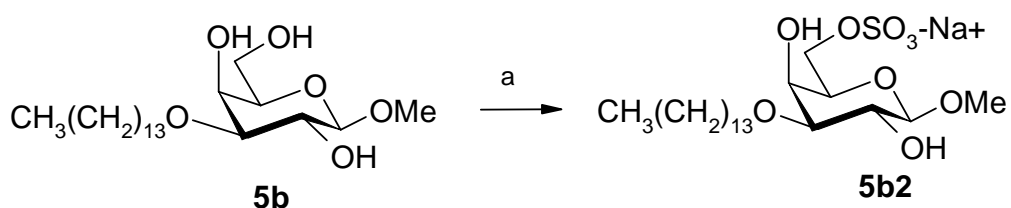




#### 4.6.4. Sulfatação regiosseletiva do composto **5b** via acetal de dibutilestanileno.

O composto **5b** foi submetido a uma condição de sulfatação regiosseletiva via acetal de dibutilestanileno utilizando o complexo  $\text{Me}_3\text{N}.\text{SO}_3$  em THF a temperatura ambiente (GUILBERT *et al.*, 1994 – **Figura 72**). Uma vez que OH-3 já estava substituído, a sulfatação ocorreu com alto rendimento e regiosseletividade em OH-6, mostrando que este método pode ser útil para ativar reações nesta posição quando a hidroxila preferencial encontra-se bloqueada. O produto **5b2** (metil 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-galactopiranosose 6-sulfato, sal sódico) foi obtido em rendimentos praticamente quantitativos (96%) apresentando-se como cristais na forma de cubos incolores depois de recristalizado (acetato de etila:metanol, 4:1). Os dados referentes a caracterização espectrométrica, espectroscópica e físico-química do produto **5b2** são mostrados no **ANEXO 1**.

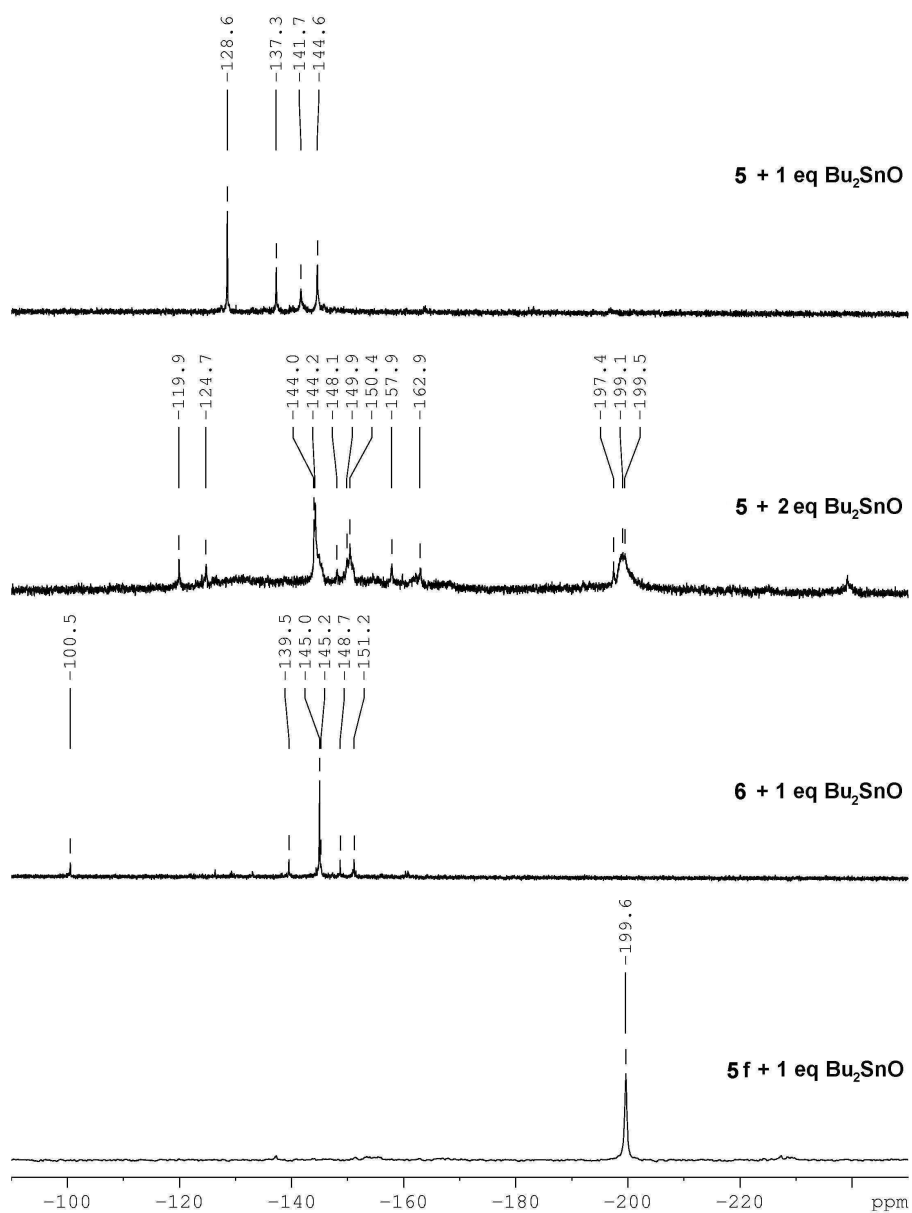
**Figura 72:** Sulfatação do 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp: a)  $\text{Bu}_2\text{SnO}$ /tolueno, refluxo por 15 h; remoção do tolueno;  $\text{SO}_3.\text{NMe}_3$ /THF, temperatura ambiente por 48 h; resina catiônica em forma sódica.



#### 4.6.5. Estudo dos acetais de dibutilestanileno por RMN de $^{119}\text{Sn}$

Para o melhor entendimento das vias pelas quais estas reações acontecem, amostras para espectro de RMN de  $^{119}\text{Sn}$  de vários tipos de acetais de dibutilestanilenos foram preparados. Alguns espectros destas amostras são apresentados na **Figura 73**. Inicialmente, algumas amostras foram preparadas sem precauções para a exclusão de água e os espectros correspondentes apresentaram um grande número de picos em adição aqueles apresentados na **Figura 73**, particularmente na região de  $-150$  até  $-160$  ppm. Estes picos adicionais presumivelmente se originam a partir de produtos de hidrólise parcial dos dímeros de acetais de dibutilestanileno (GRINDLEY, 1998). Os espectros correspondentes às amostras seladas e preparadas em linha de vácuo mostraram-se praticamente livres destes sinais adicionais. Preparações em duplicatas geraram espectros reproduzíveis.

**Figura 73:** Espectros de RMN de  $^{119}\text{Sn}$  de soluções dos acetais de dibutilestanileno dos compostos **5**, **6**, e **5f** em  $\text{CDCl}_3$ .



Como mostrado na **Figura 73**, todos os sinais de RMN  $^{119}\text{Sn}$  aparecem na região de  $-100$  até  $-200$  ppm. Esta é a região do espectro onde átomos de estanho na forma de dibutildialcoxiestanho absorvem se o átomo de estanho é pentacoordenado (GRINDLEY, 1998); átomos de estanho tetracoordenados absorvem em  $-40$  até  $+100$  ppm, enquanto os hexacoordenados absorvem entre  $-230$  e  $-300$  (GRINDLEY & THANGARASA, 1990; GRINDLEY *et al.*, 1992a). Para os acetais de dibutilestanileno, os átomos de estanho em 2,2-dibutil-1,3-dioxastanolanos absorvem entre  $-110$  e  $-155$  ppm (KONG & GRINDLEY, 1994) enquanto a faixa de 2,2-dibutil-1,3-dioxastanano estudado, a absorção ocorre entre  $-180$  e  $-190$  ppm (KONG & GRINDLEY, 1994; GRINDLEY *et al.*, 1992b)

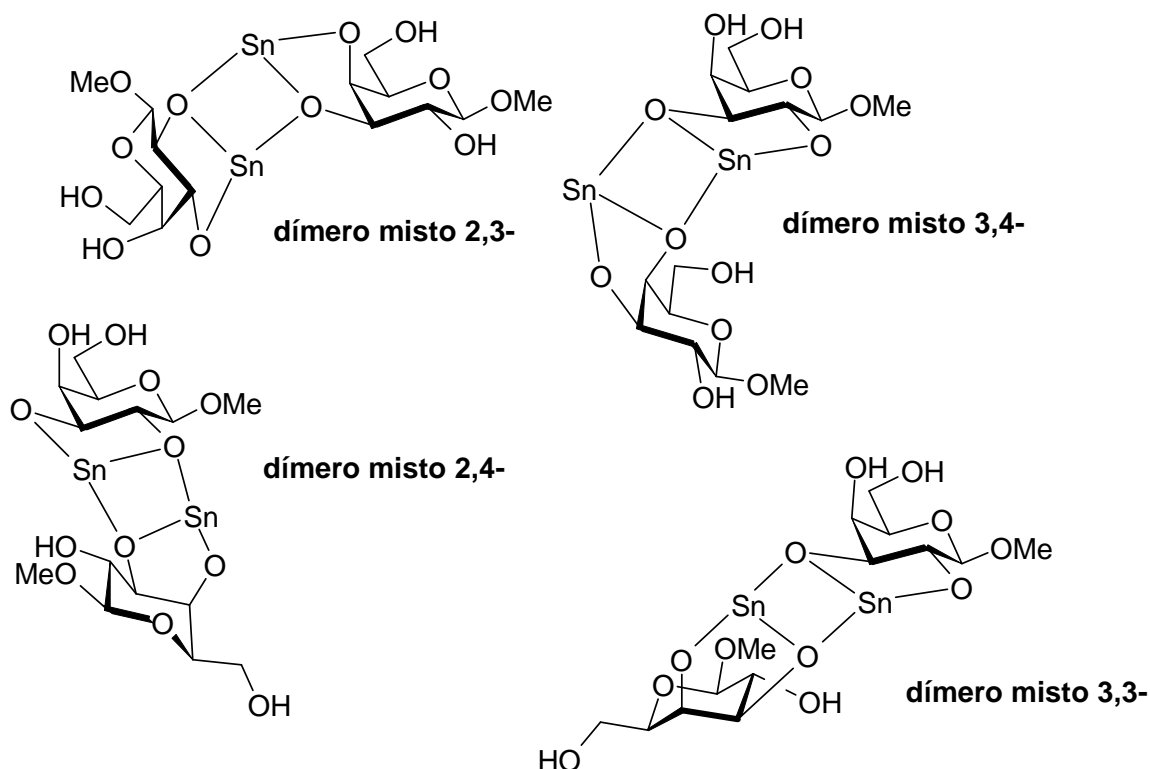
O espectro de  $^{119}\text{Sn}$  da amostra produzida pela reação do composto **5** com um equivalente de óxido de dibutilestanho apresentou quatro sinais entre  $-128$  e  $-144$  sendo o primeiro ( $-128,6$ ) mais intenso que os demais. Os sinais em  $-137,3$  e  $-144,6$  apresentaram aproximadamente a mesma intensidade e o sinal em  $-141,0$  mostrou-se o menos intenso. O acetal de dibutilestanileno, estudado em trabalhos anteriores (DAVID *et al.*, 1981), derivado do benzil 2,6-di-O-benzil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo apresentou um único sinal em  $-125,6$ , enquanto o acetal derivado do benzil 4,6-di-O-benzilideno- $\beta$ -D-galactopiranosídeo absorvia em  $-145$  ppm (DAVID *et al.*, 1981; GRINDLEY & THANGARASA, 1990). Uma vez que todos esses assinalamentos estão numa faixa esperada para estanho pentacoordenado, estes compostos estão presentes como dímeros em solução. Quando dímeros são formados, um átomo de oxigênio de cada unidade monomérica torna-se tricoordenado. Se estes compostos são nomeados usando o número dos oxigênios tricoordenados (GRINDLEY & THANGARASA, 1990), para o acetal 2,3-di-O-dibutilestanileno, existem três possibilidades de homodímeros: 2,2-; 2,3-; e 3,3-. Existiriam também três possíveis homodímeros para o acetal 3,4-O-dibutilestanileno: 3,3-, 3,4- e 4,4-. Entretanto, nos acetais de dibutilestanileno feitos a partir de dióis, somente um dímero  $\text{C}_2$ -simétrico foi formado, o dímero 2,2- para o acetal 2,3-di-O-dibutilestanileno. Uma estrutura dimérica não foi totalmente estabelecida no caso do acetal 3,4-O-dibutilestanileno, apesar de uma provável

simetria indicada por somente um sinal de RMN de  $^{119}\text{Sn}$  para o acetal benzil 2,6-di-O-benzil-3,4-O-dibutiestanileno- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (DAVID *et al.*, 1981).

A reação de  $\text{Br}_2$  com acetais de dibutilestanileno é muito rápida e irreversível, revelando sempre o dímero presente em maior população (DAVID, 1974; DAVID & THIÉFFRY, 1979), ocorrendo a oxidação seletiva do carbono ligado ao oxigênio tricoordenado (KONG & GRINDLEY, 1993). Uma vez que os acetais benzil 2,6-di-O-benzil-3,4-O-dibutiestanileno- $\beta$ -D-galactopiranosídeo e benzil 2-O-benzil-3,4-O-dibutiestanileno- $\beta$ -D-fucopiranosídeo são oxidados em O-4 (DAVID & THIÉFFRY, 1979), o acetal 3,4-O-dibutilestanileno apresenta-se como um homodímero 3,3-.

A partir destes dados obtidos pelo estudo de dióis em trabalhos anteriores, a estrutura de acetais de dibutilestanileno obtidos a partir de polióis (especificamente galactosídeos livres) vinha sendo considerada como a mesma obtida para os dióis derivados de galactosídeos com OH-3 e OH-4 livres, ou seja, considerava-se a formação única e exclusiva de um acetal 3,4-O-dibutilestanileno. Entretanto, os estudos de RMN de  $^{119}\text{Sn}$  realizados no presente trabalho mostram a coexistência de duas unidades monoméricas diferentes. Este dado nos levou a propor quatro possibilidades adicionais aos homodímeros: os dímeros mistos 2,3-; 2,4-; 3,3- e 3,4-. Estes possíveis dímeros mistos estão representados na **Figura 74**.

**Figura 74:** Dímeros mistos possíveis a partir do composto **5**.



Os sinais de RMN de  $^{119}\text{Sn}$  em  $-128.6$  e  $-141.7$  ppm, proveniente do acetal de dibutilestanileno do composto **5** (**Figura 73**), apresentam intensidades particularmente diferenciadas. Tratando-se de uma solução contendo uma mistura de dímeros, é muito provável que estes sinais sejam originados dos homodímeros  $\text{C}_2$ -simétricos. Os outros dois sinais de intensidades similares são provavelmente originados de um dímero não simétrico. A conclusão que melhor se encaixa as observações feitas a partir de estudos de acetais de dibutilestanileno derivados de dióis é que as estruturas presentes são determinadas pela preferência de unidades monoméricas para formação de dímeros particulares. Sob esta hipótese, os três dímeros presentes em ordem de intensidade do sinal são: (a) o homodímero 3,3- do acetal 3,4-O-dibutilestanileno; (b) o dímero misto 2,3- e (c) o homodímero 2,2- do acetal 2,3-O-dibutilestanileno. O dímero misto 2,3- foi

considerado o mais provável uma vez que a unidade 3,4-O-dibutilestanileno tem preferência para formar dímeros nos quais O-3 é tricoordenado, enquanto o unidade 2,3-O-dibutilestanileno tem preferência em formar dímeros com O-2 tricoordenado. Os dois sinais de mesma intensidade presente no espectro da **Figura 73** (composto **5** + 1 eq Bu<sub>2</sub>SnO), são então originados pelos dois núcleos de estanho em situações diferentes dentro de um mesmo dímero.

O espectro de RMN de <sup>119</sup>Sn do produto de reação de dois equivalentes de óxido de dibutilestanho com o composto **5** (**Figura 73** – composto **5** + 2 eq Bu<sub>2</sub>SnO) contém sinais alargados em –199 ppm e –144 ppm, respectivamente. Este sinais são consistentes com formação dos acetais de dibutilestanileno em 4,6- e 2,3- ligações (DAVID *et al.*, 1981; GRINDLEY & THANGARASA, 1990; GRINDLEY *et al.*, 1992a). A formação de dois anéis dioxadiestanho a partir de cada monossacarídeo resulta em um polímero; os sinais alargados são então devidos ao alargamento causado pela maior rapidez do T<sub>2</sub> originada pela maior massa molecular do composto resultante.

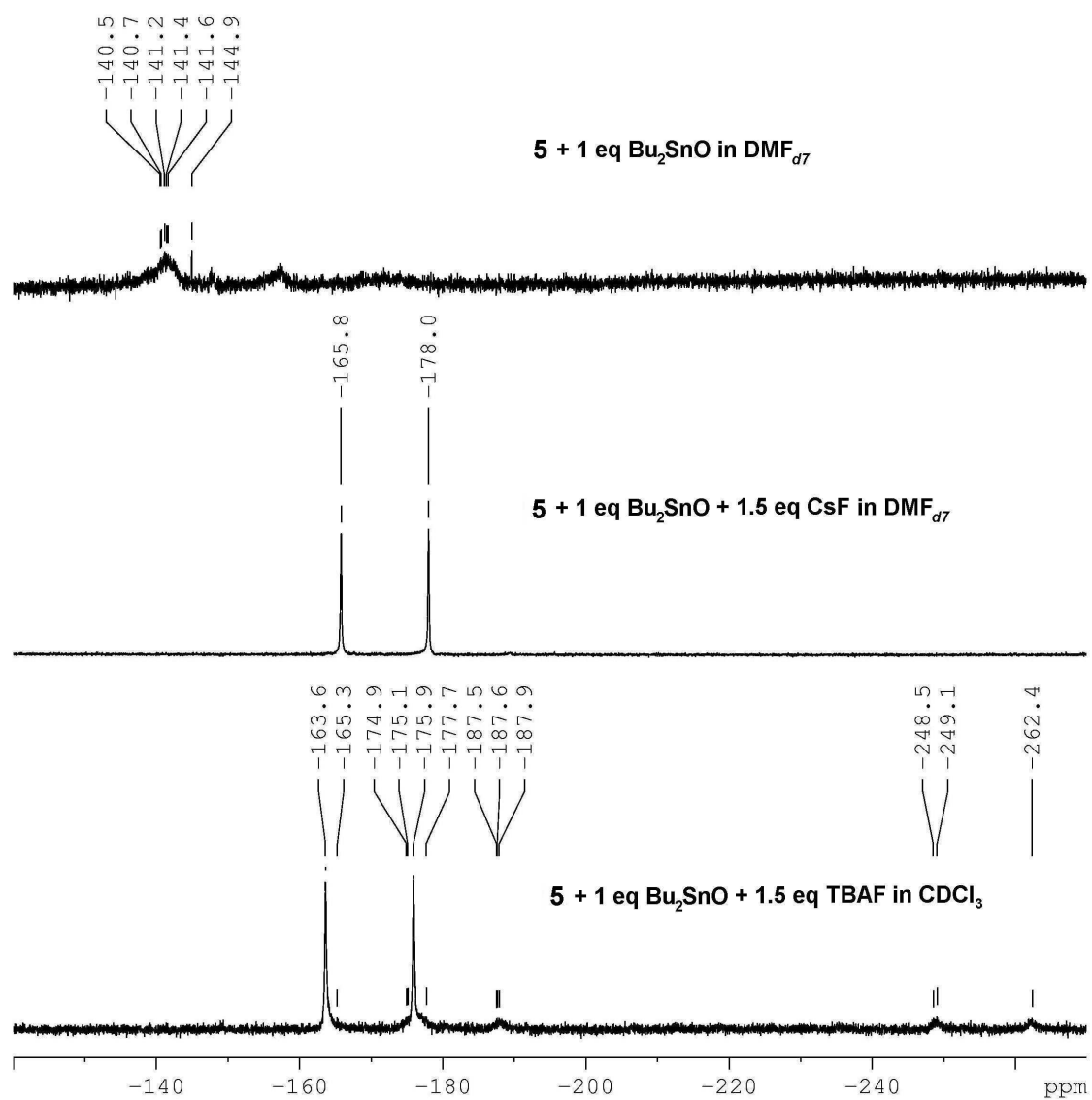
O acetal de dibutilestanileno formado pela reação de um equivalente de óxido de dibutilestanho com o metil 6-O-tritil-β-D-galactopiranosídeo (**Figura 73** - composto **6** + 1 eq Bu<sub>2</sub>SnO) é um acetal 2,3-O-dibutilestanileno C<sub>2</sub>-simétrico, presumivelmente o homodímero 2,2-. A formação preferencial desta estrutura (e não o acetal 3,4-dibutilestanileno) foi provavelmente causada pelo impedimento estérico do volumoso grupo tritil (trifenilmetil). O metil 3-O-decil-β-D-galactopiranosídeo (**Figura 73** - composto **5f** + 1 eq Bu<sub>2</sub>SnO) não pode formar acetais de dibutilestanileno com anéis de cinco membros e o espectro de RMN de <sup>119</sup>Sn de seu acetal de dibutilestanileno contém somente um sinal em –199.6 ppm, consistente com um homodímero acetal 4,6-O-dibutilestanileno C<sub>2</sub>-simétrico (GRINDLEY, 1998).

As reações de alquilação dos acetais de dibutilestanileno foram realizadas em DMF na presença de fluoreto de cézio. Desta forma, as estruturas destes intermediários também foram estudadas no referido solvente com e sem a presença do catalisador.

Os espectros da **Figura 75** mostram que antes da adição de CsF, o intermediário apresentava-se em uma estrutura polimérica (sinal alargado). Após a adição do catalisador, o espectro tornou-se extremamente simplificado apresentando somente dois sinais referentes ao acoplamento do átomo do fluoreto adicionado com o núcleo de estanho. Para fins de confirmação, um experimento similar foi realizado em  $\text{CDCl}_3$  tendo fluoreto de tetrabutylamônio como doador do halogênio. Os resultados obtidos foram extremamente similares (após a adição de fluoreto) para os dois solventes.



**Figura 75:** Espectros de RMN de  $^{119}\text{Sn}$  de soluções dos acetais de dibutilestanileno em  $\text{DMF}_{d7}$ .

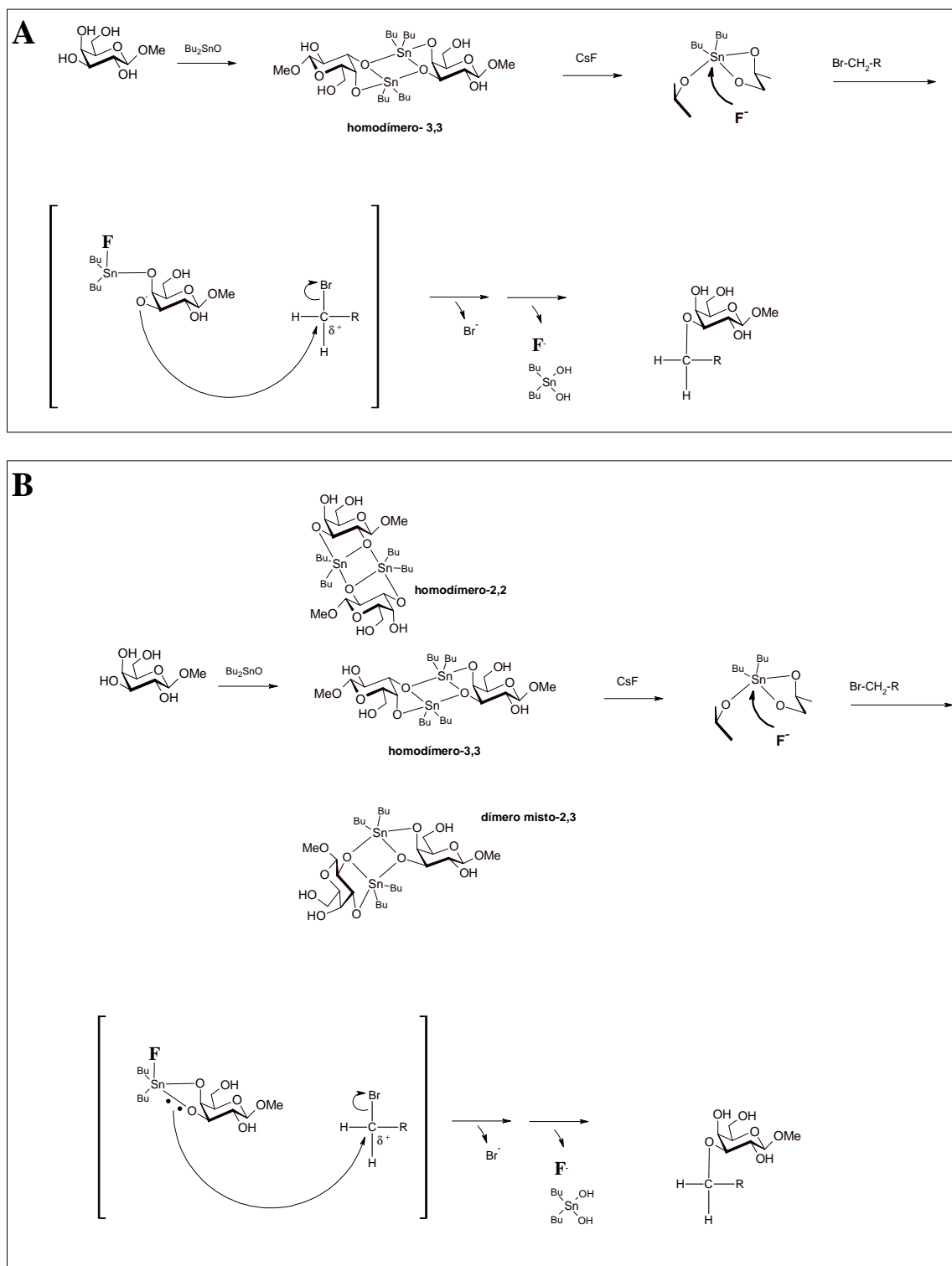


É importante destacar que a análise de RMN de  $^{119}\text{Sn}$  de acetais de dibutilestanileno na presença de catalisadores jamais havia sido realizada. Com isso foi demonstrado que o anion fluoreto realmente ataca o núcleo de estanho nesta situação, o que já havia sido proposto, em teoria, por DANISHEFSKI & HUNGATE (1986) e NAGASHIMA & OHNO (1987). Esta ligação é evidente devido ao aparecimento de dois sinais simétricos resultantes do acoplamento do núcleo de flúor com o átomo de estanho (**Figura 75**).

É também estabelecido que após a ligação do halogênio catalisador no núcleo de estanho, uma das ligações do acetal é desfeita e a reação ocorre exatamente no oxigênio que teve a ligação rompida (NAGASHIMA & OHNO, 1991). No presente trabalho, interpretações dos espectros de  $^{119}\text{Sn}$  dos acetais de dibutilestanileno em  $\text{DMF}_{d7}$  ou  $\text{CDCl}_3$ , com ou sem adição de fluoreto, sugerem que este mecanismo, considerado correto há muitos anos, não é verdadeiro.

Analisando os espectros da **Figura 75**, observa-se que mesmo após o ataque do átomo de flúor ao núcleo de estanho, os sinais apresentam-se na região de estanho pentacoordenado. Desta forma, o arranjo estrutural com o núcleo de estanho tetracoordenado (**Figura 18**, item 1.5., e **Figura 76A**), proposto por NAGASHIMA & OHNO (1991), mostra-se inviável. Tudo indica que o acetal mantém-se íntegro após a ligação do halogênio catalisador, a estrutura dimérica passa à forma monomérica. A **Figura 76A** mostra o mecanismo geral que vinha sendo proposto para a reação intermediada por acetal de dibutilestanileno com adição de ânions fluoreto enquanto a **Figura 76B** mostra o mecanismo proposto, baseado nos resultados obtidos neste trabalho.

**Figura 76:** Mecanismo de reação para a alquilação de um metil galactopiranosídeo livre: (A) anteriormente estabelecido; (B) proposto neste trabalho.



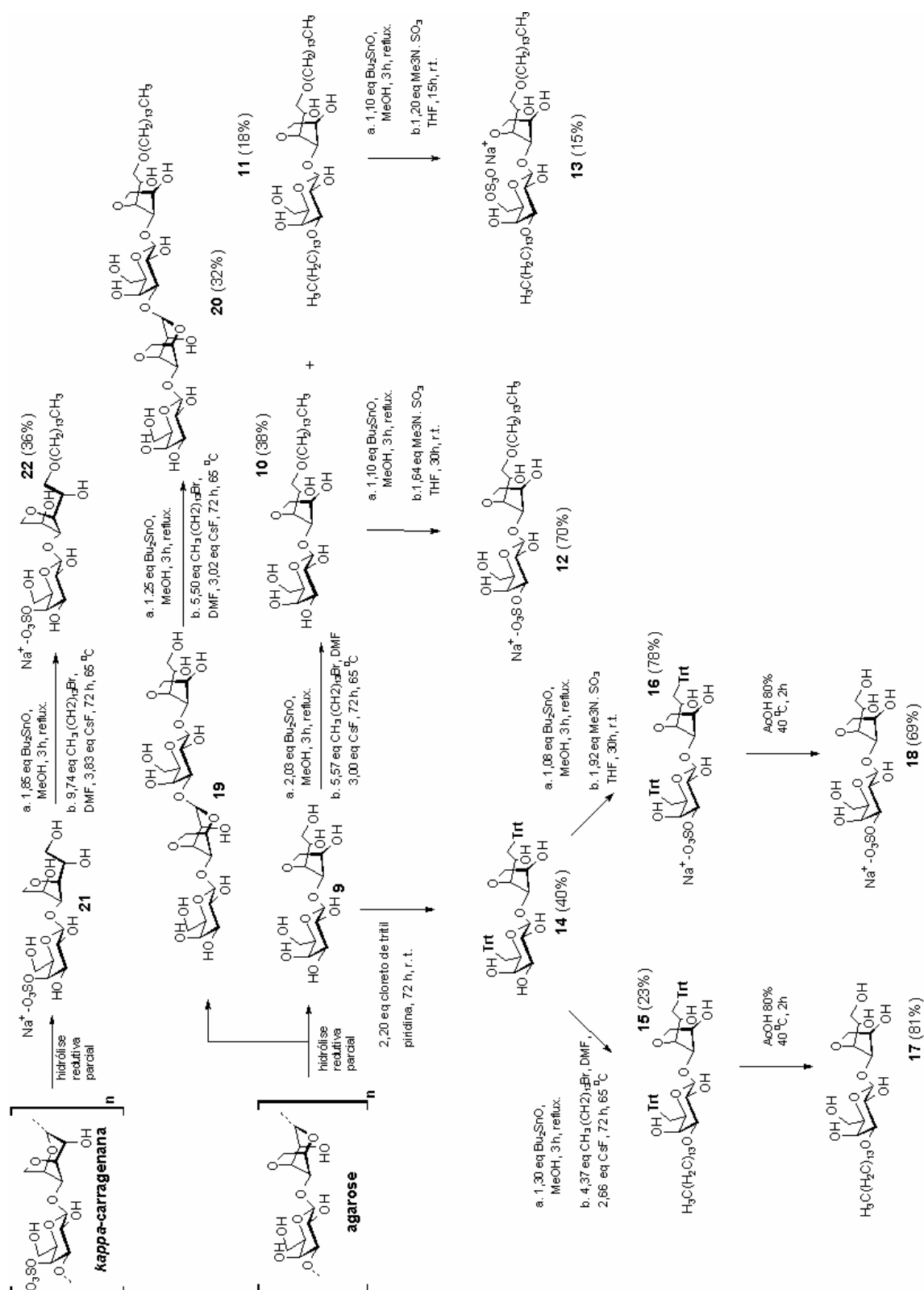
#### 4.6.6. Modificações químicas dos oligossacarídeos alditóis.

Após a determinação das condições ideais de alquilação e estudo do mecanismo de reação dos intermediários dos galactosídeos sintéticos, os oligossacarídeos alditóis previamente obtidos HRP foram submetidos aos mesmos processos sintéticos estudados. As reações realizadas nesta etapa do trabalho e as estruturas dos produtos obtidos estão representadas na **Figura 77**. A caracterização estrutural dos compostos apresentados na **Figura 77** (assinalamentos, espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de ESIMS), bem como suas propriedades físico-químicas, estão disponíveis no **ANEXO 2**, seguindo a numeração utilizada na **Figura 77**.

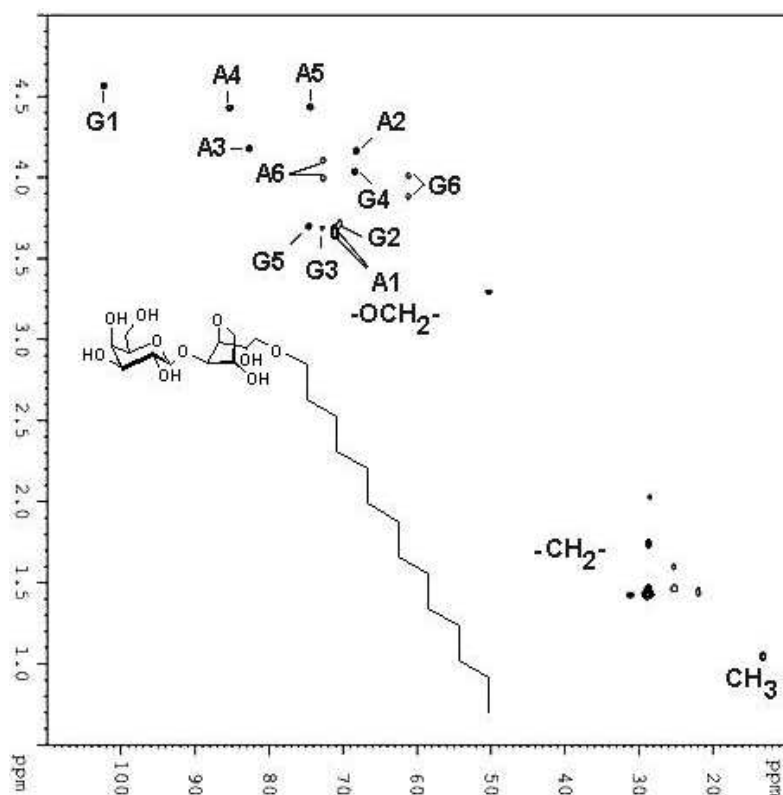
O dissacarídeo alditol agarobiitol (**9**) foi submetido a duas condições de alquilação: (a) 1,10 equivalentes de  $\text{Bu}_2\text{SnO}$ ; 6,50 equivalentes de brometo de tetradecila e (b) 2,03 equivalentes de  $\text{Bu}_2\text{SnO}$ ; 5,57 equivalentes de brometo de tetradecila. Com a condição “a”, foi obtido um produto monoalquilado em O-1 da unidade reduzida (composto **10** – **Figura 78**) com rendimento de 25%. A condição “b” gerou o composto **10** (38%) e o derivado dialquilado em O-1 e O-3 (composto **11**) com 18% de rendimento. Estes resultados mostram claramente que a alquilação ocorre preferencialmente em O-1 da unidade reduzida, e não em OH-3 do anel galactopiranosídico.

Os produtos **10** e **11** ainda foram submetidos a sulfatação utilizando as mesmas condições testadas para a produção do metilgalactosídeo sintético **5b2**. A partir de **10**, obteve-se o produto sulfatado em O-3 do anel galactopiranosídico (composto **12**) com rendimento de 70%. Desta reação também se obteve uma mistura de isômeros monoalquilados dissulfatados, os quais não puderam ser separados. Uma vez que o produto **11** apresentava as duas hidroxilas preferenciais já substituídas, esperava-se o produto principal da sulfatação intermediada por acetal de dibutilestanileno se apresentasse substituído em O-6 da unidade de galactopiranosose em alto rendimento. Entretanto, para essa reação obteve-se um rendimento extremamente baixo (15%) com a presença de alguns contaminantes oligossacarídicos, os quais não puderam ser removidos.

**Figura 77:** Rota semi-sintética dos compostos **10** à **22**



**Figura 78:** Espectro de HSQC do composto **10**. **G** e **A** correspondem a unidades Galp and 3,6-AnGalOH, respectivamente.



Com o intuito de obter um derivado monoalquilado em O-3 da unidade de galactopirranose foi realizado o bloqueio das hidroxilas primárias do composto **9** através do uso da reação de tritilação utilizada no composto **5** para obtenção do composto **6**. Como o composto **9** apresenta duas hidroxilas primárias, OH-1 (unidade de 3,6-anidrogallactitol) e OH-6 (unidade de galactopirranose), foram utilizados 2,20 equivalentes de cloreto de tritil sendo o tempo de reação estendido para 72 h. Desta reação foi obtido o agarobiitol 1<sup>1</sup>,6<sup>2</sup>-di-O-tritilado (**14**) em um rendimento de 40%. Tendo o grupo OH-1 da unidade alditol bloqueado, o composto **14** foi submetido a alquilação com 1,30 equivalentes de Bu<sub>2</sub>SnO e 4,37 equivalentes de brometo de tetradecila a 65°C por 72 h. O composto ditritilado e alquilado em O-3 da unidade de galactopirranose (**15**) foi obtido em rendimento modesto (23%). O composto **14** ainda foi submetido à condição de sulfatação estabelecida gerando o produto ditritilado e sulfato (**16**) com rendimento de 78%.

Para remoção dos grupos tritil dos compostos **15** e **16** primeiramente foi utilizado o método emprega sulfato de cobre em benzeno sob refluxo por 5 h. A partir desta metodologia não foi possível obter-se os produtos desejados devido a dificuldades na purificação dos produtos de reação. Uma outra metodologia utilizando ácido acético a 80% em água por 2 h a 40 °C promoveu a fácil obtenção dos produtos desejados **17** (81%) e **18** (69%).

O tetrassacarídeo alditol neutro (agarotetraitol – **19**) foi submetido a condições similares de alquilação gerando o composto monoalquilado em OH-1 da unidade de 3,6-anidrogallactitol **20** com rendimento de 32%.

O oligossacarídeo alditol naturalmente sulfatado, carrabiitol 4-sulfato (**21**), também foi submetido a reação de alquilação formando o produto **22** (36%). Os dados referentes à análise estrutural do composto **22** mostram que o grupo sulfato originalmente presente no composto manteve-se integro e a alquilação foi reagioseletivamente dirigida ao OH-1 da unidade reduzida. Isso demonstra que estas condições propiciam a alquilação de oligossacarídeos naturalmente sulfatados.

#### 4.8. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-HSV DOS GLICOSÍDEOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS.

Os glicosídeos semi-sintéticos sulfatados e alquilados (compostos **12**, **13** e **22**), o dissacarídeo alditol monossulfatado agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato, e a mistura de isômeros dissulfatados/monoalquilados (denominada de **iso-mix**, onde o principal componente é o glicosídeo  $\beta$ -D-Galp 3,6-dissulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH - **Figura 79**) foram submetidos a ensaios de atividade antiviral. Para tal, estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Virologia do Departamento de Química Biológica da Universidade de Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina).

A atividade antiviral dos compostos selecionados foi determinada frente ao vírus da herpes simplex (HSV). Foram utilizadas as cepas de referência HSV-1 (F) e HSV-2 (G), causadoras do herpes labial e genital, respectivamente. Adicionalmente, ainda foi utilizada a cepa HSV-2 (MS), que é responsável por casos de herpes genital em pacientes acometidos por esclerose múltipla. Nestes ensaios foram determinadas as  $CI_{50}$  (concentração inibitória 50%), comparando culturas tratadas com as não tratadas. Este valor corresponde à concentração de determinado composto que ocasiona 50% de inibição na formação de placas de lise (placas virais).

Estes resultados preliminares (**Tabela 9**) mostram que o composto **22** apresenta atividade contra as três cepas de HSV estudadas. Já a mistura de isômeros (**iso-mix**) apresentou atividade significativa apenas contra a cepa HSV-1 (F) sendo esta atividade inferior quando comparada a qualquer dos resultados apresentados pelo composto **22**. Os compostos **12**, **13** e agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato não apresentam atividade significativa contra a cepa HSV-1 (F) e, por esta razão, não foram testados contra as outras cepas.

Considerando que o composto **13** (dissacarídeo alditol simultaneamente dialquilado e monossulfatado) não apresentou atividade, e que a mistura de isômeros dissulfatados/monoalquilados (**iso-mix**) foram ativas contra HSV-1 (F), pode-se concluir que o fator hidrofobicidade é menos importante que o grau de sulfatação para a atividade destes compostos. Ainda é possível que exista um



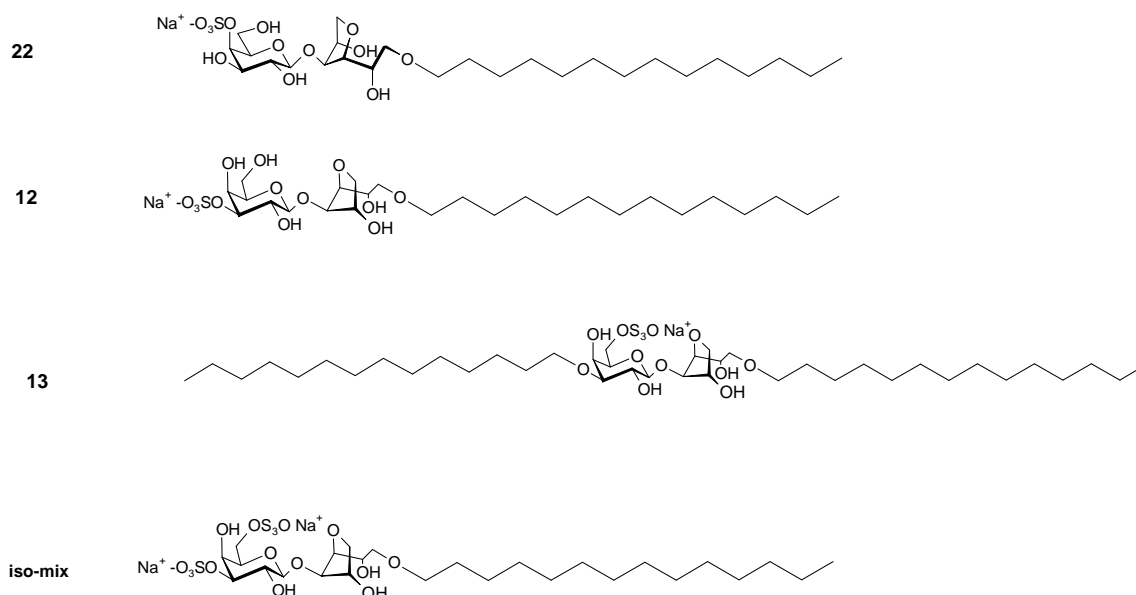
balanço ideal entre o índice de sulfatação/hidrofobicidade para que estes compostos sejam ativos.

É importante observar que os compostos **12** e **22** apresentam a mesma relação de índice de sulfatação/hidrofobicidade, ou seja, ambos são dissacarídeos alditóis monossulfatados e monoalquilados. Entretanto, o composto **22** mostrou-se ativo contra todas cepas estudadas enquanto o composto **12** apresentou-se inócuo. Com estas observações é evidente que a propriedade biológica do composto **22** é inerente à pelo menos uma das diferença com seu isômero **12**. O composto **12** possui o grupo sulfato em C-3 do anel  $\beta$ -galactopiranosídico e sua unidade galactitol pertence a série L. Já o composto **22** é sulfatado em C-4 do mesmo anel e apresenta a unidade galactitol pertencente a série D. Deste modo, atividade antiviral recai sobre o posicionamento do grupo sulfato e/ou isomeria ótica da unidade 3,6-anidrogactitol.

O dissacarídeo agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato não foi ativo contra as cepas testadas, enquanto o seu polissacarídeo precursor, agarose 2-sulfato, apresenta alta atividade anti-HSV-I (DUARTE *et al.*, 2004). Este resultado já era esperado considerando que altas massas moleculares estão diretamente relacionadas com atividade antiviral contra os vírus testados (SCHOLS *et al.*, 1992; WITVROUW *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2002).

Com estes resultados, foi possível demonstrar que a posição do grupo sulfato e a presença de porções hidróbicas são de suma importância no que se diz respeito à atividade antiviral destes compostos.

**Figura 79:** Alquilglicosídeos sulfatados submetidos aos ensaios para a verificação da atividade anti-HSV.



**Tabela 9:** Concentração inibitória 50 % ( $CI_{50}$ ) apresentada pelos compostos **12**, **13** e **22**, e pelo mistura de isômeros dissulfatados/monossulfatados (**iso-mix**).

Composto	Concentração inibitória 50 % ( $CI_{50}$ ) $\mu\text{g/ml}$		
	HSV-1 (F)	HSV-2 (G)	HSV-2 (MS)
<b>12</b>	> 50	nd	nd
<b>Iso-mix</b>	$36,1 \pm 5,23$	> 50	$\cong 50$
<b>13</b>	> 50	nd	nd
<b>22</b>	$29,82 \pm 1,8$	$24,80 \pm 3,9$	$15,08 \pm 0,99$
<b>Agarobiitol 2<sup>2</sup>-OSO<sub>3</sub></b>	> 50	nd	nd

nd = não determinada

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a hidrólise redutiva parcial foi utilizada para produzir oligossacarídeos alditóis a partir de galactanas sulfatadas repetitivas obtidas de quatro diferentes espécies de Rhodophyta: *kappa*-carragenana (*Kappaphycus alvarezii*), *theta*-carragenana (*Gigartina skottsbergii* – *lambda*-carragenana pós tratamento alcalino), agarose 6-sulfato (*Gracilaria domingensis*), e agarana 2-sulfato piruvilada (*Acanthophora spicifera* – agarana sulfatada piruvilada pós tratamento alcalino). Cada polissacarídeo hidrolisado foi submetido a cromatografias de troca aniônica e filtração em gel. Os oligossacarídeos alditóis isolados foram caracterizados por espectroscopia de RMN em 1D e 2D e por espectrometria de ESIMS. As seguintes estruturas foram caracterizadas nesta etapa:

- ✓  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarobiitol)
- ✓ 4,6-(1-carboxietilideno)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol)
- ✓  $\beta$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato)
- ✓ 4,6-(1-carboxietilideno)- $\beta$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-piruvil agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato)
- ✓  $\beta$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarotetraitol 2<sup>2</sup>,2<sup>4</sup>-dissulfato)
- ✓  $\beta$ -D-Galp 4-sulfato 1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-D-GalOH (carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato)
- ✓  $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-D-GalOH (carratetraitol 4<sup>2</sup>,4<sup>4</sup>-dissulfato)

- ✓  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-D-GalOH 2-sulfato (carrabiitol 2<sup>1</sup>-sulfato)
- ✓  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An- $\alpha$ -D-Galp 2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-D-GalOH 2-sulfato (carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-dissulfato)
- ✓  $\beta$ -D-Galp 6-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato)

Oligossacarídeos neutros também foram preparados a partir de agarose comercial, utilizando, além da hidrólise redutiva parcial, um método hidrolítico que emprega o uso de ácido clorídrico concentrado. Nestes casos a purificação dos compostos foi realizada através de extração e precipitação com solventes orgânicos, seguido de cromatografias de filtração ou em coluna de sílica:

- ✓  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4-)-3,6-An- $\alpha$ -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH (agarotetraitol)
- ✓  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4-)-3,6-An- $\alpha$ -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3,6-An-L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Galp

Alguns dos oligossacarídeos alditóis produzidos apresentaram-se como isômeros de posição de grupo sulfato, sendo demonstrado que alguns deles apresentavam fragmentação diferencial pelo uso da dissociação induzida por colisão (CID) nas análises de ESIMS/MS. Esta propriedade mostrou-se predominante quando os grupos sulfato apresentam-se em unidades monossacarídicas diferentes.

Estes isômeros também foram completamente separados por eletroforese capilar em tampão contendo íons borato. A correlação entre a viabilidade das hidroxilas passíveis à complexação com o borato, e a migração relativa dos oligossacarídeos foi demonstrada. Este mesmo método de separação foi também utilizado para acompanhar o processo de hidrólise redutiva parcial, através da análise de diferentes tempos da mistura de hidrólise, para diferentes modelos de

galactanas sulfatadas. Com isso foi demonstrado que o posicionamento dos grupos sulfato presentes nestas galactanas influencia a velocidade de hidrólise redutiva parcial. Nos casos estudados, quanto mais próximo da ligação 3,6-anidrogactosídica estiver o grupo sulfato, mais prolongado é o tempo para a formação dos oligossacarídeos. Aparentemente, os grupos sulfatos dificultam a hidrólise redutiva parcial quando estes estão próximos a ligação alvo.

Tendo estudado cuidadosamente todos os aspectos para preparação dos oligossacarídeos, metilgalactosídeos sintéticos foram utilizados para o desenvolvimento de condições de alquilação regioseletiva para a introdução de longas cadeias alquila através do uso de intermediários organo-estanho. Também foi demonstrado que grupos sulfato podem ser introduzidos regioseletivamente em carbono primário através destes intermediários. Para o cumprimento desta etapa, foram preparados os seguintes compostos:

- ✓  $\beta$ -D-Galp pentaacetato
- ✓ 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-bromo- $\alpha$ -D-Galp
- ✓ Me 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me  $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 6-O-*tert*-butildimetilsilil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 6-O-tosil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp

- ✓ Me 3,6-di-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 3-O-dodecil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 3,6-di-O-dodecil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 3-O-decil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 3,6-di-O-decil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 3-O-tetradecil-6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp
- ✓ Me 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp 6-sulfato, sal sódico

Os intermediários destas reações foram estudados por espectroscopia de RMN de  $^{119}\text{Sn}$ , sendo demonstrado que algumas deduções tidas como verdadeiras sobre as estruturas destes compostos em solução eram equivocadas. Especificamente, foi demonstrado que uma solução de um acetal de dibutilestanileno formado a partir de um galactosídeo livre, apresenta três formas diméricas diferentes, incluindo um dímero misto (o que jamais havia sido observado). Além disso, um novo mecanismo de reação para este tipo de intermediário, em presença de fluoreto de sódio, foi proposto. Tudo indica que não ocorre cisão das ligações O-Sn antes da alquilação propriamente dita. O mecanismo anteriormente estabelecido propunha quebra da referida ligação.

As condições de alquilação foram então aplicadas para a síntese de éteres com longas cadeias alquila a partir de alguns dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial. Nesta etapa foram obtidos os seguintes compostos:

- ✓  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH
- ✓ 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH

- ✓  $\beta$ -D-Galp-(1→4)-3,6-An-L-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH
- ✓ 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH
- ✓ 3-O-tetradecil-6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH
- ✓ 6-O-tritil- $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1→4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH, sal sódico
- ✓ 3-O-tetradecil-D-Galp-(1→4)-3,6-An-L-GalOH
- ✓  $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1→4)-3,6-An-L-GalOH, sal sódico
- ✓ D-Galp 3-sulfato- $\beta$ -(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH
- ✓ 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp 6-sulfato-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH, sal sódico
- ✓ 4-O-sulfato- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-D-GalOH, sal sódico

Os glicosídeos semi-sintéticos sulfatados e alquilados foram testados frente a três cepas do vírus HSV. Neste estudo, o composto  $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-D-GalOH mostrou-se ativo para todas as cepas virais, enquanto o seu isômero,  $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH mostrou-se inerte para todas as cepas. Estes resultados indicam que fatores, tais como a posição de grupos sulfato, são cruciais na atividade antiviral de carboidratos sulfatados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAIS, J.; MARANDUBA, A.; VEYRIÈRES, A. Regioselective mono-O-alkylation of disaccharide glycosides through their dibutylstannylene complexes **Tetrahedron Lett.**, **24**: 2383-2386, 1983

ALTRIA, K. D., **Capillary Electrophoresis Guidebook**, Humana Press, Totowa, pp. 3-103, 1996.

ARAKI, C.; HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXI. Re-investigation of methylated agarose of *Gelidium amansii*. **Bull. Chem. Soc. Japan**, **33**: 291-295, 1960.

AUGÉ, C.; NARVOR, C.; LUBINEAU, A., Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Carbohydrates in Europe**, **27**: 22-32, 1999.

BARCZAI-MARTOS, M.; KÖRÖSY, Preparation of acetobromo-sugars. **Nature**, **165**: 369, 1950.

BOESEKEN, J., The use of boric acid for the determination of the configuration of carbohydrates. **Adv. Carbohydr. Chem.**, **4**: 189-210, 1949.

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C. A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S., Anti-herpetic and anticoagulant properties of carragenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, **20**: 97-105, 1997.

CARNEY, S. L.; OSBORNE, D. J., The separation of chondroitin sulfate disaccharides and hyaluronan oligosaccharides by capillary zone electrophoresis. **Anal. Biochem.**, **195**: 132-140, 1991.



CAUDURO, J. P., Estudo Estrutural de Galactanas Sulfatadas e Piruvatadas isoladas de *Acanthophora spicifera*. **Tese de Mestrado**, ed. UFPR, Curitiba, pp. 103, 2000.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D. J.; MUNRO, S. L.; KAFT, G. T.; LIAO, M. L., Cell-wall polysaccharides from australiam red algae of family Solieraceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carragenans from genus *Callophycus*. **Carbohydr. Res.**, **299**: 229-243, 1997.

COLLINS. P. ; FERRIER, R., **Monosaccharides**. Wiley Press, Colchester, 1995.

COLÓN, L. A.; DADOO, R.; ZARE, R. B., Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a copper microelectrode. **Anal. Chem.**, **65**: 476-481, 1993.

COREY, E. J.; VENKATESWARLU, A., Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives. **J. Am. Chem. Soc.**, **94**: 6190-6191, 1972.

CROWE, J.; CROWE, L.; CARPENTER, J.; WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochem. J.**, **242**: 1-10, 1987.

CRUZADO, M. C.; MARTIN-LOMAS, M., The regioselectivity of tributyltin ether-mediated benzylation of 1,6-anhydro- $\beta$ -D-hexopyranoses. **Carbohydr. Res.**, **175**: 193-199, 1988.

DANISHEFSKY, S. J.; HUNGATE, R., Total synthesis of octosyl acid A: A new departure in organostannylene chemistry. **J. Am. Chem. Soc.**, **108**: 2486-2487, 1986.

DAVID, S.; THIÉFFRY, A.; FORCHIONI, A.  $^{119}\text{Sn}$  nuclear magnetic resonance and mass spectrometric studies of the stannylenes of chiral and achiral diols: an

interpretation of their regiospecific activation. **Tetrahedron Lett.**, **22**: 2647-2650, 1981.

DAVID, S. C. R.; THIÉFFRY, A., The bromolysis reaction of stannylene derivatives: A regiospecific synthesis of carbohydrate-derived hydroxy-ketone. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**: 1568-1573, 1979.

DAVID, S. C. R., Selective conversion of cyclane  $\alpha$  diols into ketols (acyloins) by bromine treatment of their organotin derivative. **Acad. Sci., Ser. C**, **278**: 1051-1053, 1974.

DAVIS, H. B; MOTT, C. J. B., Interaction of boric acid and borates with carbohydrates and related substances. **J. Chem. Soc., Faraday Trans.**, **76**: 1991-2002, 1980.

DESCROIX, S.; VARENNE, A.; GOASDOUE, N.; ABIAN, J.; CARRASCAL, M.; DANIEL, R.; GAREIL, P. Non-aqueous capillary electrophoresis of the positional isomers of a sulfated monosaccharide. **J. Chromatogr. A**, **987**: 467-476. 2003.

DOBLE, P.; HADDAD, P. R. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, **834**: 189-212, 1999.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. G.; TULIO S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B., Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, **8**: 53-58, 2001a.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; CARDOSO, M. A; TULIO, S; CEREZO A. S., The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei* **Carbohydr. Res.**, **337**: 1137-1144, 2001b.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO A. S., The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Res.**, **339**: 335-347, 2004.

DUCATTI, D. R. B., Oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial de polissacarídeos de algas vermelhas: Estudos de ressonância magnética nuclear. **Tese de Mestrado**, ed. UFPR, Curitiba, pp. 112, 2005.

DUBOIS, M.K.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, **28**: 350-356, 1956.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W, The structure of agar. Part II. The use of a bacterial agarase to elucidate structural features of the charged polysaccharides in agar. **Carbohydr. Res.**, **16**: 435-445, 1971.

EL RASSI, R., **High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrates**, Beckman Instruments Inc., Fullerton, pp. 1-32, 1996.

EKBERG, T.; MAGNUSSON, G. Synthesis of the monodeoxy derivatives of 2-(trimethylsilyl)ethyl  $\beta$ -lactoside **Carbohydr. Res.**, **246**: 119-136, 1993.

EKEBERG, D.; KNUTSEN, S. H.; SLETMOEN, M., Negative-ion electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) as a tool for analysing structural heterogeneity in *kappa*-carrageenan oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, **334**: 49-59, 2001.

EVANGELISTA, R. A.; CHEN, F. A.; GUTTMAN, A. reductive amination of *N*-linked oligosaccharides using organic acid catalysts. **J. Chromatogr. A**, **745**: 273-280, 1996.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. **Carbohydr. Res.**, **325**: 287-299, 2000.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents **Carbohydr. Res.**, **339**: 2575-2592, 2004.

FERNÁNDEZ, P.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; MARTÍN-LOMAS, M. Syntheses of all the possible monomethyl ethers and several deoxyhalo analogues of methyl  $\beta$ -lactoside as ligands for the *Ricinus communis* lectins. **Carbohydr. Res.**, **254**: 61-79, 1994.

FOSTER, A. B.; STACEY, M. J., Ionophoresis of carbohydrates. Part II. Some pyranose and furanose derivatives of D-glucose. **J. Chem. Soc.**, 1778-1781, 1955.

GONÇALVES, A. G., Oligossacarídeos piruvatados e sulfatados obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas (Rhodophyta). **Tese de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, pp. 103, 2001.

GREEN, C. W.; YAPHE, W., Characterization of hybrid (Beta-Kappa-Gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rodophyta, Solieraceae) using garragenases, infrared and  $^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Bot. Marina**, **27**: 473-478, 1984.

GRINDLEY, T. B., Application of tin-containing intermediates to carbohydrate chemistry. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, **53**: 17-142, 1998.

GRINDLEY, T. B.; NAMAZI, H., The regioselective synthesis of novel non-glycosidically linked oligosaccharides. **Tetrahedron Lett.**, **37**: 991-994, 1996.

GRINDLEY, T. B.; KONG, X. Q., Inversion of regioselectivity in reactions of diols through the use of hexamethylenestannylene acetals as intermediates. **Tetrahedron Lett.**, **34**: 5231-5234, 1993.

GRINDLEY, T. B.; WASYLISHEN, R. E.; THANGARASA, R.; POWER, W. P.; CURTIS, R. E., Tin-119 NMR of 1,3,2-diaxastannolanes and 1,3,2-diaxastannane in the solid state. **Can. J. Chem.**, **70**: 205-217, 1992a

GRINDLEY, T. B.; THANGARASA, R.; BAKSHI, P. K.; CAMERON, T. S., The structure of 2,2-dibutyl-1,3,2-dioxastannane in the solid state and in solution. **Can. J. Chem.**, **70**: 197-204, 1992b.

GRINDLEY, T. B.; THANGARASA, R., The structures and reactions of stannylene acetals from carbohydrate-derived *trans*-diols. Part I. In the absence of nucleophiles. **Can. J. Chem.**, **68**: 1007-1019, 1990.

GUILBERT, B.; DAVIS, N. J.; PEARCE, M.; APLIN, R. T.; FLITSCH, S. L., Dibutylstannylene acetals: Useful intermediates for the regioselective sulfation of glycosides. **Tetrahedron: Asymmetry**, **5**: 2163-2178, 1994.

GUIMARÃES, M. Aspectos Fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídio para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 88, 2000.

HIRASE, S., Studies on the chemical constitution of *agar-agar* XIX. Pyruvic acid as a constituent of *agar-agar*. Part II – isolation of the pyruvic acid linking

disaccharide derivative isolated from the methanolysis products of agar. **Bull. Chem. Soc. Japan.**, **30**: 70-75, 1957.

HOFFSTETTER-KUHN, S.; PAULUS, A.; GASSMANN, E.; WIDMER, H. M., Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. **Anal. Chem.**, **63**: 1541-1547, 1991.

HOLECEK, J., NADVORNIK, M., HANDLIR, K., LYCKA, A., C-13 and Sn-119 nmr-spectra of di-normal-butylin(IV) compounds. **J. Organomet. Chem.**, **315**: 299-308, 1986.

HOSOYA, M.; BALZARINI, J.; SHIGETA, S.; DE CLERCQ, E., Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **35**: 2515-2520, 1991.

HURTLEY, S.; SERVICE, R.; SZUROMI, P., Cinderella's coach is ready, **Science**, **291**: 2337-2341, 2001.

ISHIHARA, K.; NAGASAWA, A.; UMEMOTO, K.; ITO, H.; SAITO, K., Kinetic-study of boric acid-borate interchange in aqueous-solution by B-11 nmr-spectroscopy. **Inorg. Chem.**, **33**: 3811-3816, 1994.

IZUMI, K., Structural analysis of agar-type polysaccharides by NMR spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, **320**: 311-317, 1973.

JOUBERT, P. H.; FOUKARIDIS, G. N.; BOPAPE, M. L., Miglitol may have a blood glucose lowering effect unrelated to inhibition of  $\alpha$ -glucosidase. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, **31**: 723-724, 1987.

KANDLER, O.; HOPF, H., Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In: STUMPF, P. K. & CONN, E. E. (eds.). **The biochemistry of plants; a comprehensive treatise – Carbohydrates: structure and function**, New York: Academic Press, v. 3, p. 221-226, 1980.

KARIYA, Y.; WATABE, S.; MOCHIZUKI, H.; IMAI, K.; KIKUCHI, H.; SUZUKI, K.; KYOGASHIMA, M.; ISHII, T. Modification of di- and tetrasaccharides from shark cartilage keratan sulphate by refined anhydromethanolic hydrochloric acid-treatments and evaluation of their specific desulphation. **Carbohydr. Res.**, **338**: 1133-1138, 2003.

KARTHA, K. P. R.; ALOUI, M.; FIELD, R. A. Iodine: A versatile reagent in carbohydrate chemistry. III. Efficient activation of glycosyl halides in combination with DDQ. **Tetrahedron Lett.**, **37**: 8807-8810, 1996.

KÄSBAUER, C. W.; PAPER, D. H.; FRANZ, G., Sulfated  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galactooligosaccharides and their effect on angiogenesis. **Carbohydr. Res.**, **330**: 427-430, 2001.

KATSURAYA, K.; NAKASHIMA, H.; YAMAMOTO, N.; URYU, T., Synthesis of sulfated oligosaccharide glycosides having high anti-HIV activity and the relationship between activity and chemical structure. **Carbohydr. Res.**, **315**: 234-242, 1999.

KENNEDY, J. D.; McFARLANE, W., Silicon, Germanium, Tin and Lead. In: MASON (Ed.), **Multinuclear NMR**, London, Pergamon Press, Chap. 11, 1988.

KNUTSEN, S. H.; SLETMOEN, M.; KRISTENSEN, T.; BARBEYRON, T.; KLOAREG, B.; POTIN, P., A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by *iota*- and *kappa*-carrageenase, **Carbohydr. Res.**, **315**: 101-106, 2001.

KNUTSEN, S. H.; MYSLADODSKI, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I., A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Bot. Mar.**, **37**: 163-169, 1994.

KONG, X.; GRINDLEY, T. B., An improved method for the regioselective oxidation of stannylene acetals and dimerization of the alpha-hydroxyketone products. **J. Carbohydr. Chem.**, **12**: 557-571, 1993.

KONG, X.; GRINDLEY, T. B. Control of regioselectivity in reactions of dialkylstannylene acetals. Part I. A dramatic reversal of regioselectivity in mono-p-toluenesulfonation reactions. **Can. J. Chem.**, **72**: 2405-2415, 1994.

KOOS, M.; GAJDOS, Methyl 6-O-tosyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside. **J. Molecules [Electronic Publication]**: **2**, M39, 1997.

KOSHIDA, S.; SUDA, Y.; ARANO, A.; SOBEL, M.; KUSUMOTO, S. An efficient method for the assembly of sulfated oligosaccharides using reductive amination. **Tetrahedron Lett.**, **42**: 1293-1296, 2001.

LEE, R.E. **Phycology**, Second edition. Cambridge University Press, Cambridge. 645 pp, 1989.

LIU, J.; SHRIVER, Z.; POPE, R. M.; THORP, S. C.; DUNCAN, M. B.; COPELAND, R. J.; RASKA, C. S.; YOSHIDA, K.; EISENBERG, R. J.; COHEN, G.; LINHARDT, R. J.; SASISEKHARAN R., Characterization of a heparan sulfate octasaccharide that binds to herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. **J. Biol. Chem.**, **277**: 33456 – 33467, 2002.

LORMEAU, J. C.; HERAULT, J. P.; GAICH, C.; BARZU, T.; DINTHER, T. G.; VISSER, A.; HERBERT, J. M., Determination of the anti-factor Xa activity of the synthetic pentasaccharide SR 90107/ORG 31540 and of two structural analogues. **Thromb. Res.**, **85**: 67-75, 1997.



MACCARI, F.; TRIPODI, F.; VOLPI, N. High performance capillary electrophoresis separation of hyaluronan oligosaccharides produced by *Streptomyces hyalurolyticus*. **Carbohydr. Polym.**, **56**: 55-63, 2004.

MATULEWICZ, M. C.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Methylation analysis of carrageenans from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, **29**: 3407-3410, 1990.

MIKKERS, F. E. P.; EVARAERTS, F. M.; VERHEGGEN, T. P. E. M., High-performance zone electrophoresis High-performance zone electrophoresis. **J. Chromatogr.**, **169**: 11-20, 1979.

MORRICE, L. M.; McLEAN, M. W.; LONG, W. F.; WILLIAMSON, F. B.,  $\beta$ -agarase-I and  $\beta$ -agarase-II from *Pseudomonas atlantica* substrate specificities. **Eur. J. Biochem.**, **137**: 149-154, 1983.

NAGASHIMA, N.; OHNO, M., Selective monoalkylation of acyclic diols by means of dibutyltin oxide and fluoride salts. **Chem. Pharm. Bull.**, **39**: 1972-1982, 1991.

NAGASHIMA, N.; OHNO, M., An efficient O-monoalkylation of dimethyl L-tartrate via O-stannylene acetal with alkyl-halides in the presence of cesium fluoride. **Chem. Lett.**, 141-144. 1987.

NAMAZI, H.; GRINDLEY, T. B. A novel approach to carbohydrate clusters: the regioselective synthesis of non-glycosidically linked oligosaccharides. **Can. J. Chem.**, **75**: 983-995, 1997

NASHED, M. A.; ANDERSON, L. Organotin derivatives and the selective acylation and alkylation of the equatorial hydroxy group in a vicinal, equatorial-axial pair. **Tetrahedron Lett.**, **17**: 3503-3506, 1976.

NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S., Room temperature, low-field  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of degraded carrageenans: Part III. Autohydrolysis of a lambda carrageenan and of its alkali-treated derivative. **Int. J. Biol. Macromol.**, **15**: 177-181, 1993.

NOSEDA, M. D., Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetrasporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales). **Tese de Doutorado**, ed. UFPR, Curitiba, pp. 180 , 1994.

NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S. Alkali-modification of carrageenans. II. The cyclization of model compounds containing non-sulfated  $\beta$ -D-galactose units. **Carbohydr. Polym.** **26**: 1-3, 1995.

PAINTER, T.J., Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. (Ed.) **The Polysaccharides**, Vol. 2, Academic Press, New York. pp 195-285, 1983.

PAOLETTI, L. C.; JOHNSON, K. D., Purification of preparative quantities of group B *Streptococcus* type III oligosaccharides. **J. Chromatography**, **705**: 363-368, 1995.

PARISH, C. R.; FREEMAN, C.; BROWN, K. J.; COWDEN, W. B., Identification of sulfated oligosaccharides-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. **Cancer Res.**, **59**: 3433-3441, 1999.

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F., (Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química). <http://www.chemkeys.com/> - Criado em: AGO/2001.

SCHIMIDT, R.; JUNG, K., Coupling procedures in oligosaccharide chemical synthesis. **Carbohydrates in Europe**, **27**: 12-21, 1999.

SCHIMITT-KOPPLIN, Ph.; FISCHER, K.; FREITAG, D.; KETTRUP A., Capillary electrophoresis for the simultaneous separation of selected carboxylated carbohydrates and their related 1,4-lactones. **J. Chromatogr. A**, **807**: 89-100, 1998.

SMITH, P. J.; WHITE, R. F. M.; SMITH, L., A  $^{119}\text{Sn}$  NMR and Mössbauer study of some di- and tri-alkyltin(IV) alkoxides. **J. Organomet. Chem.**, **40**: 341-353, 1972.

SCHÜLE, G.; ZIEGLER, T., Efficient convergent block synthesis of a pyruvated tetrasaccharide 5-aminopentyl glycoside related to *Streptococcus pneumoniae* type 27. **Tetrahedron**, **52**: 2952-2936, 1996.

SCHOLS, D.; PAUWELS, R.; WITVROUW, M.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ E., Differential activity of polyanionic compounds and castanospermine against HIV replication and HIV-induced syncytium formation depending on virus strain and cell type. **Antiviral Chem. Chemother**, **3**: 23-29, 1992.

SHEN, Z.; WARREN, C. D.; NEWBURG, D. S. Resolution of structural isomers of sialylated oligosaccharides by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, **921**: 315-321. 2001.

SHUKLA, D.; LIU, J.; BLAIKLOCK, P.; SHWORAK, N. W.; BAI, X.; ESKO J. D.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.; ROSENBERG, R. D.; SPEAR, P. G., A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. **Cell**, **99**: 13-22, 1999.

STANEK, J.; CERNY, M.; PACAK, J., **The oligosaccharides**. 1<sup>st</sup> Edition. Academic Press, New York, 567 pp, 1965.

STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S., Room temperature, low-field  $^{13}\text{C}$ -nmr spectra of degraded *kappa/iota* carrageenans, **Int. J. Biol. Macromol.**, **13**: 101-104, 1991.

STRÖM, A.; WILLIAMS, M. A. K. On the separation, detection and quantification of pectin derived oligosaccharides by capillary electrophoresis. **Carbohydr. Res.**, **339**: 1711-1716, 2004

SUZUKI, A.; TOYODA, H.; TOIDA, T.; IMANARI, T., Preparation and inhibitory activity on hyaluronidase of fully O-sulfated hyaluro-oligosaccharides. **Glycobiology** **11**: 57-64, 2001.

TAKANO, R.; IWANE-SAKATA H.; HAYASHI, K.; HARA S.; HIRASE, S., Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* post. et Ruprecht (Cryptonemiales, Rhodophyta). **Carbohydr. Polym.**, **52**: 81-87, 1998.

THOMPSON, A., WOLFROM, M. L.; Deacetylation. In: **Methods in Carbohydrate Chemistry**; WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L., Vol. II, Academic Press, New York, p. 215-222, 1963.

THOMSSON, K. A.; KARLSSON, H.; HASSON, G. C., Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry as a tool for the analysis of sulfated oligosaccharides from mucin glycoproteins. **J. Chromatogr. A**, **854**: 131-139, 1999.

THOMSSON, K. A.; KARLSSON, H.; HASSON, G. C., Sequencing of sulfated oligosaccharides from mucins by liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Anal. Chem.**, **72**: 4543-4549, 2000.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M., Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* (Rhodophyta, Rhodomelaceae), using partial reductive hydrolysis. **Bot. Mar.**, **34**: 553-560, 1991.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M., Polysaccharides from Algae. 51.1 Partial reductive hydrolysis of sulfated galactan from red alga *Laurencia coronopus* J. Ag. (Rhodophyta, Rhodomelaceae). **Russ. J. Bioorg. Chem.**, **23**: 502-511, 1997.

USOV, A.I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocoll.**, **12**: 301-308, 1998.

van den BERG, R.; PETERS, J. A.; van BEKKUM, H. The structure and (local) stability constants of borate esters of mono- and di-saccharides as studied by  $^{11}\text{B}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, **253**: 1-12, 1994.

van DUIN, M.; PETERS, J. A.; KIEBOOM, A. P. G.; van BEKKUM, H., Studies on borate esters II. **Tetrahedron**, **41**: 3511-3421, 1985.

VIVÉS, R. R.; GOODGER, S.; PYE, D. A., Combined strong anion-exchange HPLC and PAGE approach for the purification of heparan sulphate oligosaccharides. **Biochem. J.**, **354**: 141-147, 2001.

WALL, D.; DOUGLAS, S.; FERRO, V.; COWDEN, W.; PARISH, C., Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaccharides. **Thromb. Res.**, **325**: 325-335, 2001.

WITCZAK, Z. J., Carbohydrates as New and Old Targets for Future Drugs Design. In: WITCZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. (Ed.) **Carbohydrates in Drug Design.**, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 7-10, 1997.

WITVROUW, M.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ, E., Polysulfates: Chemistry and Potential as Antiviral Drugs. In: WITCZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. (Ed.) **Carbohydrates in Drug Design.**, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 157-207, 1997.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A., Acetylation. In: **Methods in Carbohydrate Chemistry**; WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L., Vol. II, Academic Press, New York, p. 210-215, 1963.

YANG, B. Y.; BRAND, J.; MONTGOMERY, R., Pyruvated galactose and oligosaccharides from *Erwinia corymbosa* Ech6 extracellular polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, **331**: 59-67, 2001.

YOUNG, K. S.; BHATTACHARJEE, S. S.; YAPHE, W., Enzymic cleavage of the  $\alpha$ -linkages in agarose, to yield agaro-oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, **66**: 207-212, 1978.

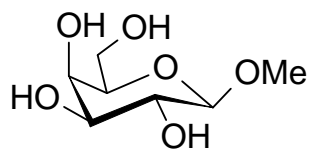
YU, G.; GUAN, H.; IOANOVICIU, A. S.; SIKKANDER, S. A.; THANAWIROON, C.; TOBACMAN, J. K.; TOIDA, T.; LINHARDT, R. J., Structural studies on  $\kappa$ -carrageenan derived oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, **331**: 433-440, 2002.

ZABLACKIS, E.; VREELAND, V.; DOBOSZEWSKI, B.; LAETSCH, W. M., Differential localization of carrageenan gelling sequences in *Kappaphycus alvarezii* Var Tambalang (Rhodophyta) with FITC-conjugated carrageenan oligosaccharides. **J. Phycol.**, **27**: 241-248, 1991.

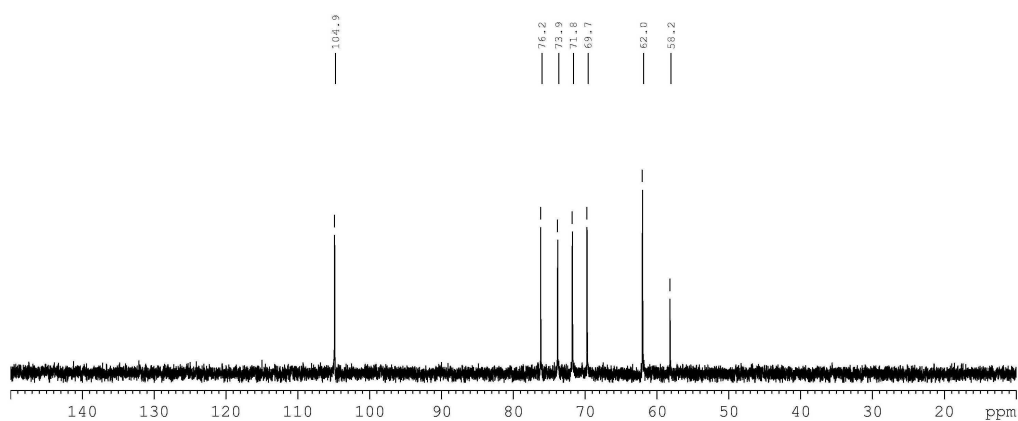
## **ANEXO 1**

**Proriedades físico-químicas e espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e ESIMS dos derivados obtidos a partir do metil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (numeração de acordo com as Figura 68 e 72)**

Composto 5: Metil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo

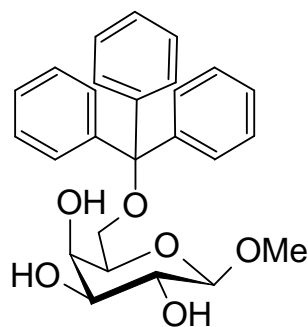


- Cristais incolores a partir de etanol absoluto, mp 175-178 °C;  $[\alpha]_D^{23} -15,5$  (c 1.0, CH<sub>3</sub>OH).



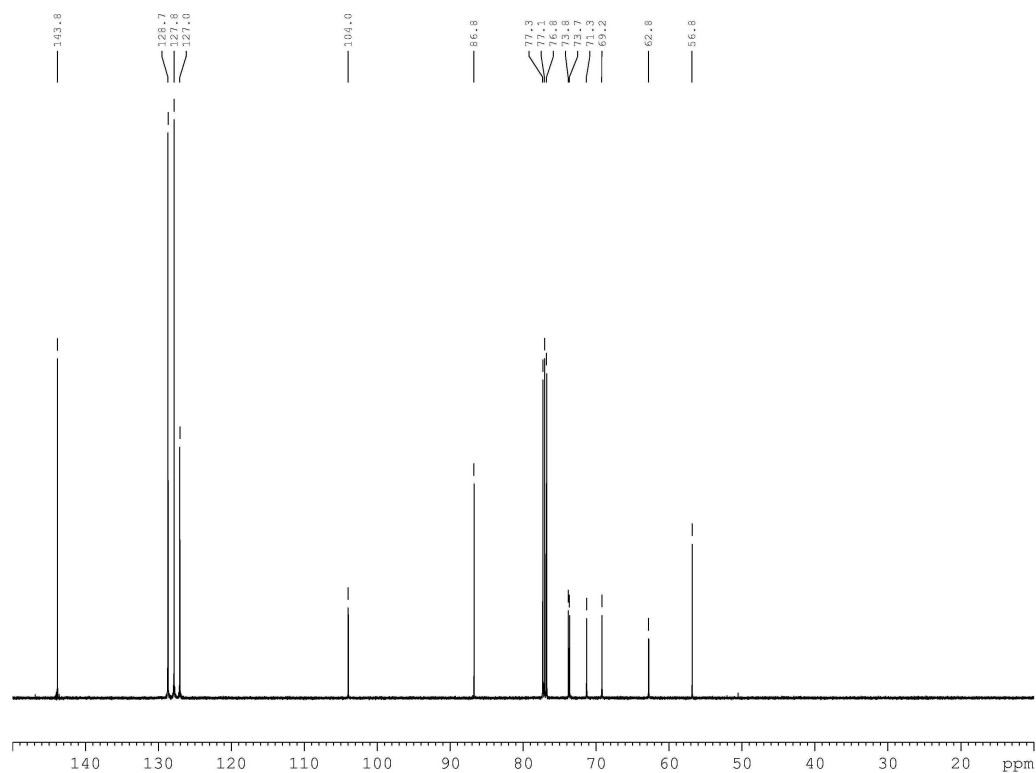


Composto 6: Metil 6-O-tritil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo



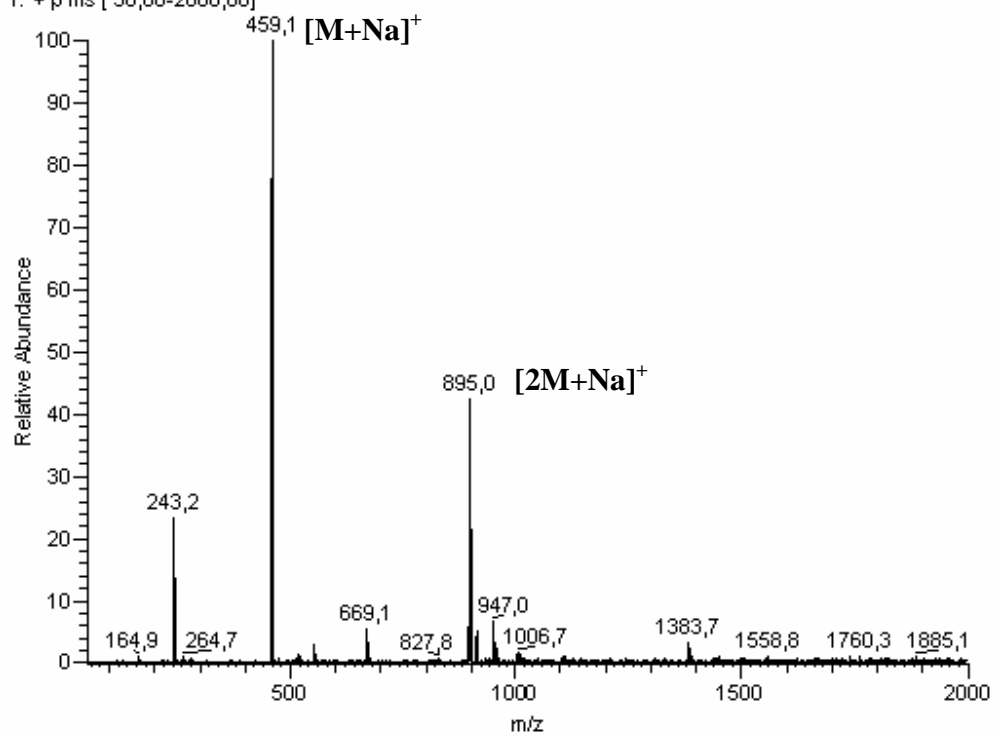
- Agulhas incolores a partir de metanol, mp 98-101 °C,  $[\alpha]_D^{23}$  -32.0 (c 0,5; CHCl<sub>3</sub>),  $R_F$  0,48 (acetato de etila). <sup>1</sup>H NMR (ppm): 2,37 (d, 1H, OH-4,  $J_{OH-4,4} = 4,1$ ), 2,51 (d, 1H, OH-3,  $J_{OH-3,3} = 2,0$ ), 2,51 (d, 1H, OH-2,  $J_{OH-2,2} = 6,3$ ), 3,40 (m, 1H, H-6,  $J_{5,6} = 6,4$ ,  $J_{6,6'} = 9,6$ ), 3,45 (m, 1H, H-6',  $J_{5,6'} = 5,5$ ), 3,56 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,58 (b, 1H, H-3), 3,59 (b, 2H, H-2, H-5), 4,04 (b, 1H, H-4), 4,15 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7,3$ ), 7,25 (b, 3H, 3 x Ar-CHCHCH), 7,31 (b, 6H, 6 x Ar-CHCHCH), 7,46 (b, 6H, 6 x Ar-CCHCH); <sup>13</sup>C NMR (ppm): 56,8 (1C, OCH<sub>3</sub>), 62,8 (1C, C-6), 69,2 (1C, C-4), 71,3 (1C, C-3), 73,7 (1C, C-2), 73,8 (1C, C-5), 86,8 (1C, OCPH<sub>3</sub>) 104,0 (1C, C-1), 127,0 (3C, 3 x Ar-CHCHCH), 127,8 (6C, 6 x Ar-CHCHCH), 128,7 (6C, 6 x Ar-CCHCH), 143,8 (3C, 3 x Ar-COCH) ESIMS:  $m/z$  459 [M+Na]<sup>+</sup>,  $m/z$  895 [2M+Na]<sup>+</sup>;

# Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **6**

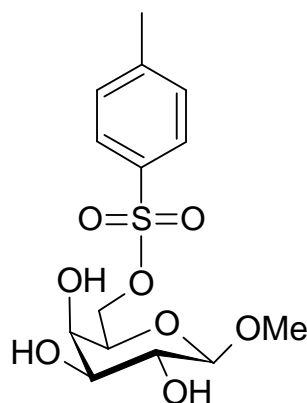


MEGALTRITYLRAW #48-51 RT: 2,18-2,31 AV: 4 NL: 5,20E6

T: + p ms [ 50,00-2000,00]

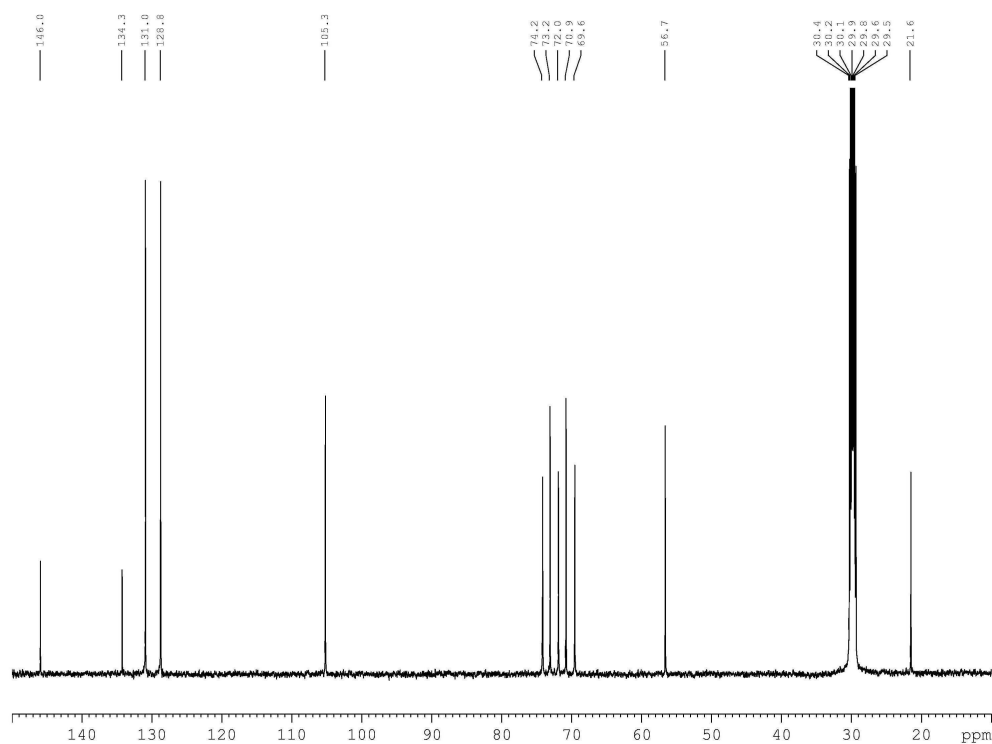


Composto 7: **Metil 6-O-tosil-β-D-galactopiranosídeo**

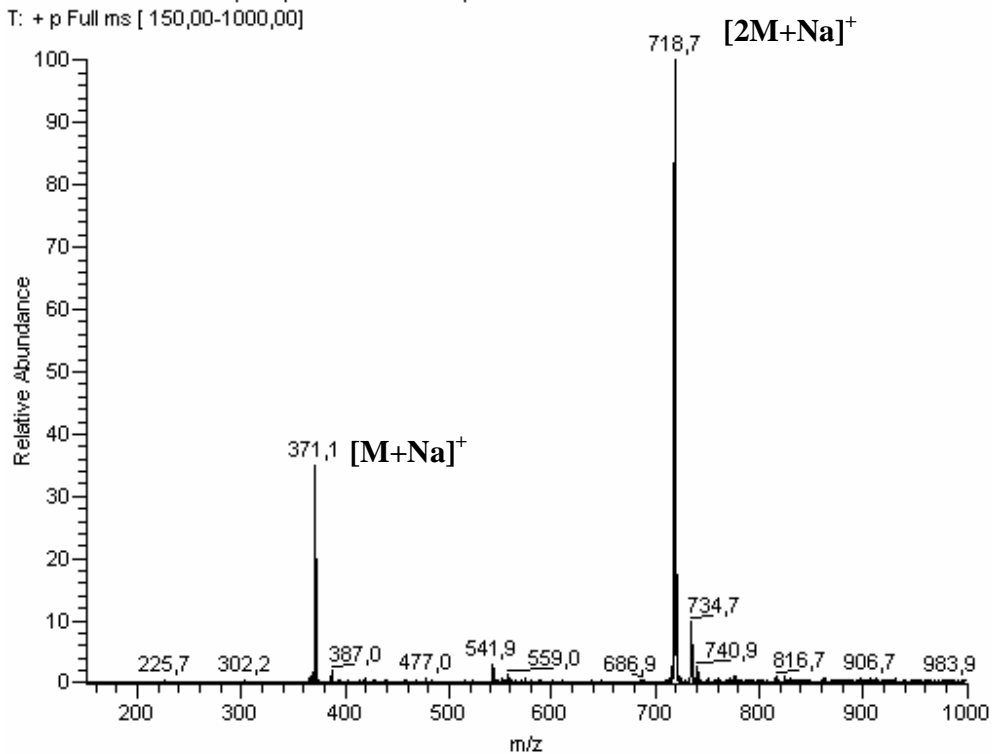


- Cristais incolores a partir de acetato de etila, mp 149-150 °C,  $[\alpha]_D^{23} -17,0$  (c 1,0; MeOH).  $^1\text{H}$  NMR (acetona  $d_6$ ) (ppm) 2,46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,39 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,45 (b, 1H, H-2), 3,51 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 9,5$ ,  $J_{3,4} = 3,4$ ), 3,78 (m, 1H, H-5), 3,82 (b, 1H, H-4), 4,09 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7,6$ ), 4,19 (dd, 1H, H-6,  $J_{5,6} = 7,5$ ,  $J_{6,6'} = 10,4$ ), 4,26 (dd, 1H, H-6,  $J_{5,6'} = 4,3$ ); 7,47-7,85 (dd, 4H, Ar-H);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  21,6 (1C,  $\text{CH}_3$ ), 56,7 (1C,  $\text{OCH}_3$ ), 69,6 (1C, C-4), 70,9 (1C, C-6), 72,0 (1C, C-2), 73,2 (1C, C-5), 74,2 (1C, C-3), 105,3 (1C, C-1), 128,8-131,0 (4C, Ar-CH), 134,3-146,0 (2C, Ar-C). ESIMS:  $m/z$  371  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  719  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

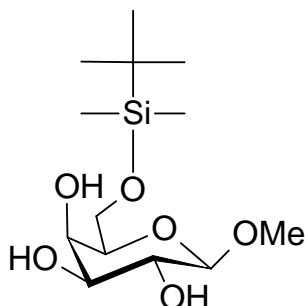
# Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **7**



Ts MeGal #72-82 RT: 1,69-1,92 AV: 11 NL: 7,88E7  
T: + p Full ms [ 150,00-1000,00]

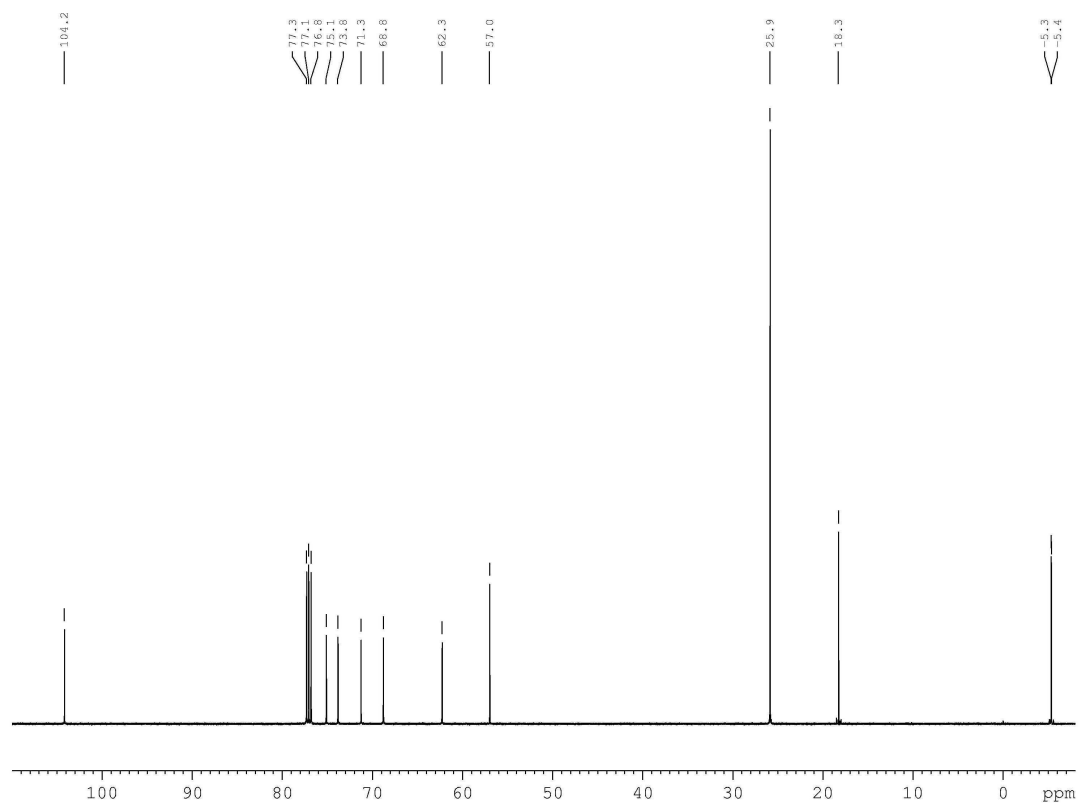


Composto 8: Metil 6-*O-tert*-butildimetilsilil-D-galactopiranosídeo

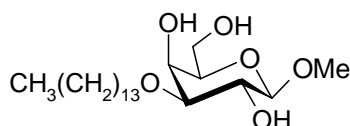


- Xarope incolor:  $[\alpha]_D^{23} -28,0$  (c 1,0;  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_F$  0,34 (acetato de etila).  $^1\text{H}$  NMR (ppm) 0,08 (s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ), 0,89 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 3,46 (t, 1H, H-5), 3,53 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,56 (b, 1H, H-3), 3,67 (t, 1H, H-2), 3,80 (dd, 1H, H-6,  $J_{5,6} = 5,7$ ,  $J_{6,6'} = 10,2$ ), 3,89 (dd, 1H, H-6',  $J_{5,6'} = 6,2$ ), 3,95 (b, 1H, H-4), 4,15 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7,6$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (ppm) -5,3, -5,4 (2C,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 18,3 (1C,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 25,9 (3C,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 57,0 (1C,  $\text{OCH}_3$ ), 62,3 (1C, C-6), 68,8 (1C, C-4), 71,3 (1C, C-2), 73,8 (1C, C-3), 75,1 (1C, C-5), 104,2 (1C, C-1).

Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **8**

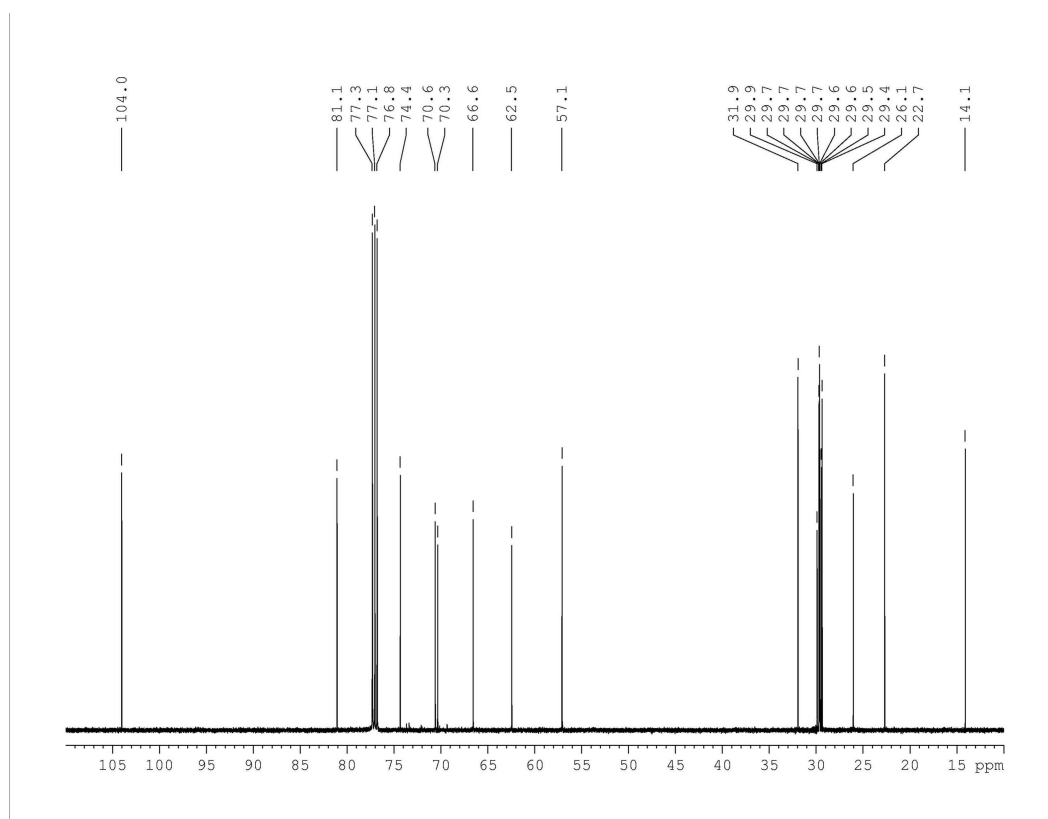


Composto **5b**: Metil 3-*O*-tetradecil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

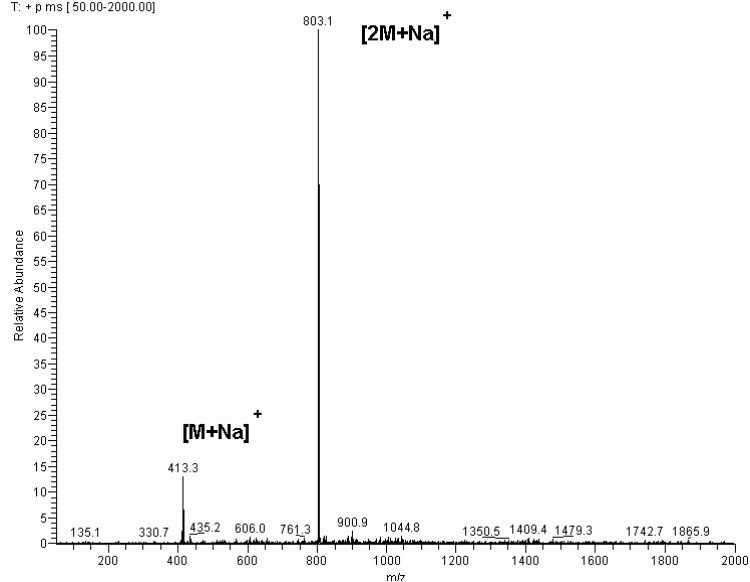


- Pó branco a partir de recristalização em hexano, mp 82-83 °C;  $[\alpha]_D^{23} +5,6^\circ$  (*c* 0,5; CHCl<sub>3</sub>), *R<sub>F</sub>* 0,37 (acetato de etila); <sup>1</sup>H NMR (ppm) 0,88 (t, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,36-1,23 (b, 22H, (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>), 1,63 (p, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,21 (q, 1H, OH-6), 2,41 (b, 1H, OH-2), 2,55 (b, 1H, OH-4), 3,31 (dd, 1H, H-3, *J*<sub>2,3</sub> = 9,4, *J*<sub>3,4</sub> = 3,4), 3,54 (b, 1H, H-5), 3,58 (b, 4H, OCH<sub>3</sub>, OCH), 3,66 (m, 1H, OCH'), 3,69 (m, 1H, H-2), 3,87 (m, 1H, H-6, *J*<sub>5,6</sub> = 4,6, *J*<sub>6,6'</sub> = 11,6, *J*<sub>6,OH-6</sub> = 8,17), 4,00 (m, 1H, H-6', *J*<sub>5,6'</sub> = 6,3, *J*<sub>6',OH-6</sub> = 3,7), 4,06 (b, 1H, H-4), 4,21 (d, 1H, H-1, *J*<sub>1,2</sub> = 7,8); <sup>13</sup>C NMR  $\delta$  14,1 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22,7 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 26,1 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29,4-29,7 (8C, (CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29,9 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31,9 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 57,1 (1C, OCH<sub>3</sub>), 62,5 (1C, C-6), 66,6 (1C, C-4), 70,3 (1C, OCH<sub>2</sub>), 70,6 (1C, C-2), 74,3 (1C, C-5), 81,1 (1C, C-3), 104,0 (1C, C-1). ESIMS: *m/z* 413 [M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* 803 [2M+Na]<sup>+</sup>

# Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **5b**

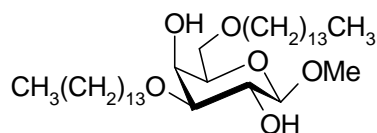


MEGALC14-2#37 RT: 1.65 AV: 1 SB: 20 0.28-1.15 NL: 1.30E6  
T: + p ms [50.00-2000.00]



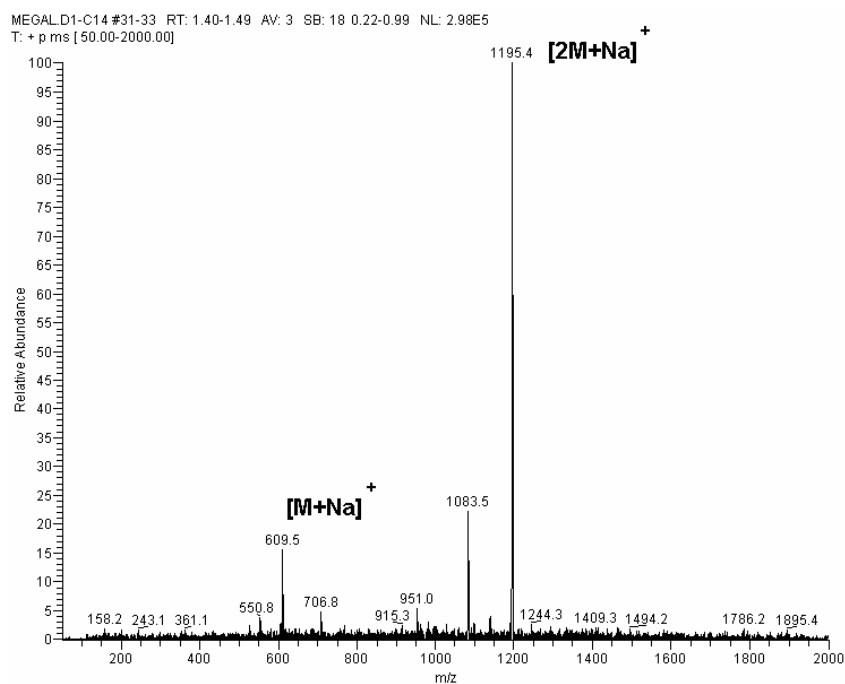
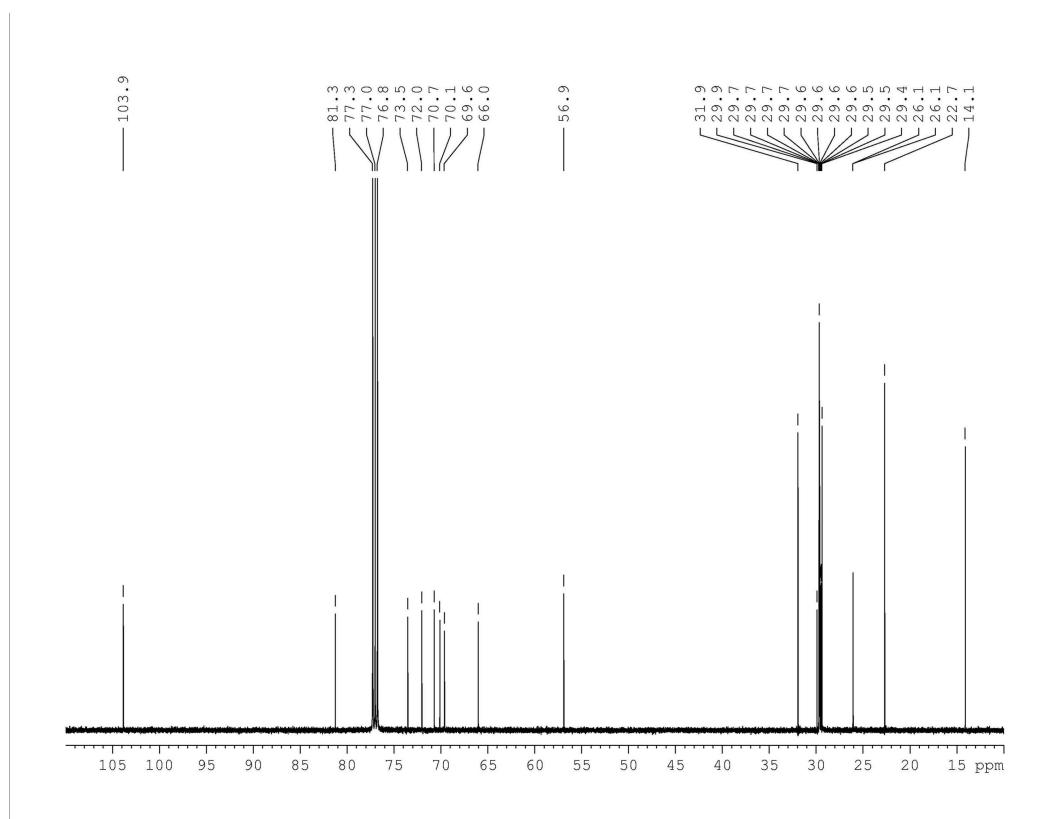


Composto **5c**: Metil 3,6-di-*O*-tetradecil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

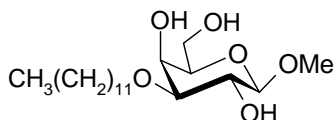


- Pó branco a partir de recristalização em etanol 95%, mp 41-43 °C;  $[\alpha]_D^{23} +4,2^\circ$  (c 0,5; CHCl<sub>3</sub>),  $R_F$  0,60 (hexano:acetato de etila, 3:2); <sup>1</sup>H NMR (ppm) 0,88 (t, 6H, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,33-1,22 (b, 44H, 2 x (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>), 1,58 (m, 2H, C-6OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,63 (m, 2H, C-3OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,44 (b, 1H, OH-2), 2,49 (b, 1H, OH-4), 3,28 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 9.5$ ,  $J_{3,4} = 3.4$ ), 3,51 (m, 2H, C-6OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3,55 (m, 1H, C-3OCH), 3,56 (b, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,57 (b, 1H, H-5), 3,67 (m, 1H, C-3OCH), 3,68 (m, 1H, H-6), 3,70 (m, 1H, H-2), 3,78 (m, 1H, H-6), 4,05 (b, 1H, H-4), 4,19 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7,8$ ); <sup>13</sup>C NMR (ppm) 14,1 (2C, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22,7 (2C, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 26,1 (2C, 2 x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29,4-29,7 (16C, 2 x (CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29,6 (1C, C-6OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29,9 (1C, C-3OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31,9 (2C, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 56,9 (1C, OCH<sub>3</sub>), 66,6 (1C, C-4), 69,6 (1C, C-6), 70,1 (1C, C-3OCH<sub>2</sub>), 70,7 (1C, C-2), 72,0 (1C, C-3OCH<sub>2</sub>), 73,5 (1C, C-5), 81,3 (1C, C-3), 103,9 (1C, C-1). ESIMS:  $m/z$  610 [M+Na]<sup>+</sup>,  $m/z$  1196 [2M+Na]<sup>+</sup>.

## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **5c**

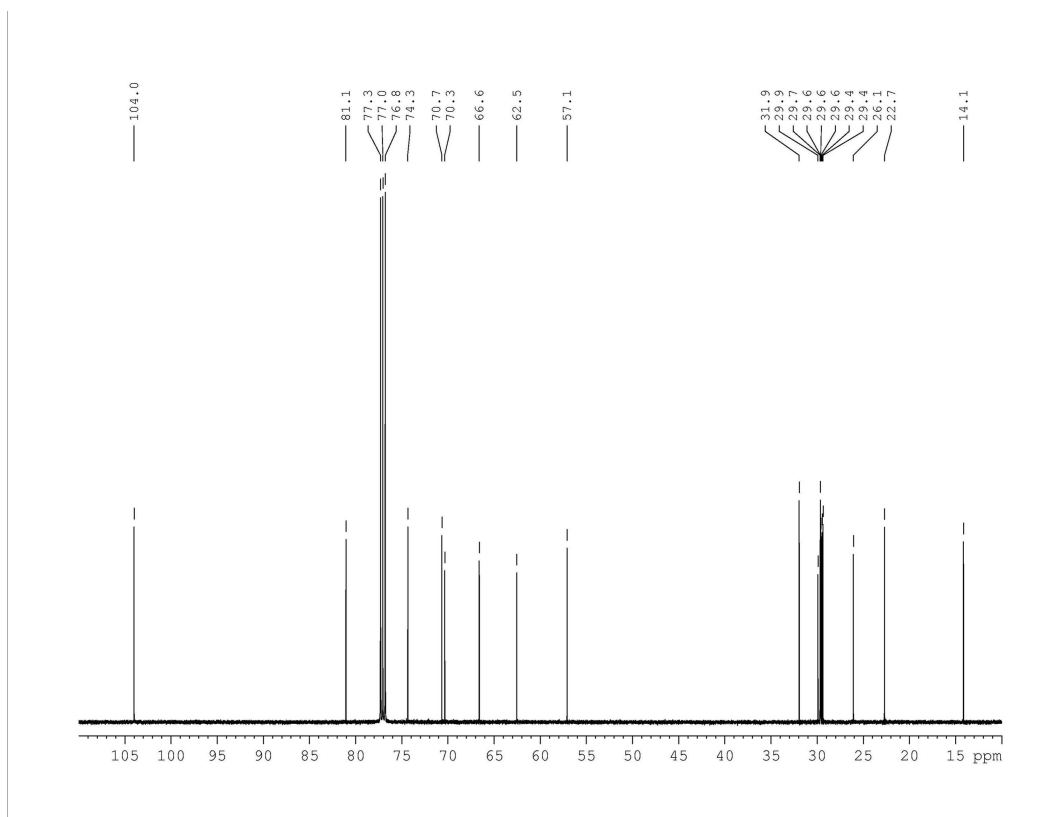


Composto **5d**: Metil 3-*O*-dodecil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

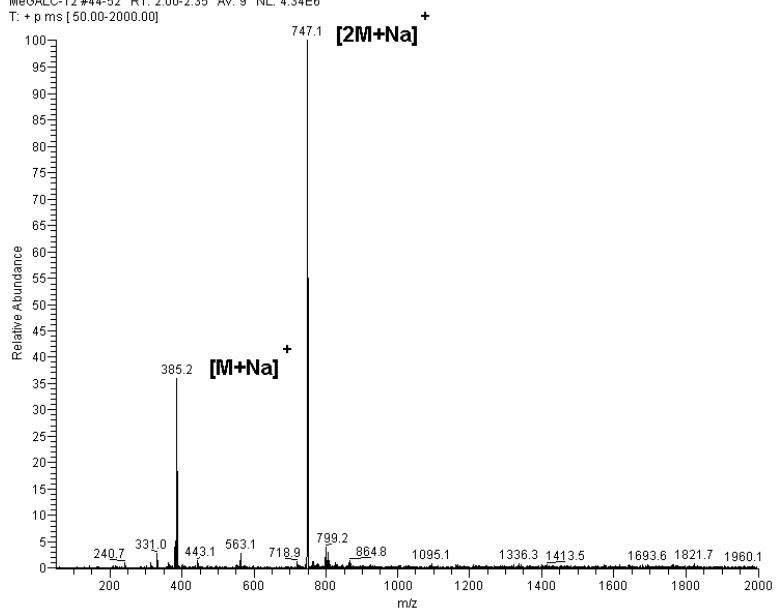


- Pó branco a partir de recristalização em hexanes, mp 83-85 °C;  $[\alpha]_D^{23} +7,6^\circ$  (c 0,5; CHCl<sub>3</sub>),  $R_F$  0,34 (acetato de etila); <sup>1</sup>H NMR (ppm) 0,88 (t, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,34-1,24 (b, 18H, (CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>), 1,63 (p, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,33 (q, 1H, OH-6), 2,49 (b, 1H, OH-2), 2,61 (b, 1H, OH-4), 3,30 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 9,5$ ,  $J_{3,4} = 3,4$ ), 3,53 (b, 1H, H-5), 3,58 (b, 4H, OCH<sub>3</sub>, OCH), 3,66 (m, 1H, OCH'), 3,69 (m, 1H, H-2), 3,86 (m, 1H, H-6,  $J_{5,6} = 4,7$ ,  $J_{6,6'} = 11,6$ ,  $J_{6,OH-6} = 8,4$ ), 3,99 (m, 1H, H-6',  $J_{5,6'} = 6,4$ ,  $J_{6',OH-6} = 4,0$ ), 4,06 (b, 1H, H-4), 4,21 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7,8$ ); <sup>13</sup>C NMR (ppm) 14,1 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22,7 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 26,1 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29,4-29,7 (6C, (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29,9 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31,9 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 57,1 (1C, OCH<sub>3</sub>), 62,5 (1C, C-6), 66,6 (1C, C-4), 70,3 (1C, OCH<sub>2</sub>), 70,7 (1C, C-2), 74,3 (1C, C-5), 81,1 (1C, C-3), 104,0 (1C, C-1). ESIMS:  $m/z$  385 [M+Na]<sup>+</sup>,  $m/z$  747 [2M+Na]<sup>+</sup>.

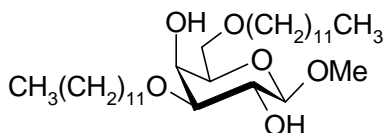
## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **5d**



MeGALC-12 #44-52 RT: 2.00-2.35 AV: 9 NL: 4.34E6  
T: + p ms [50.00-2000.00]

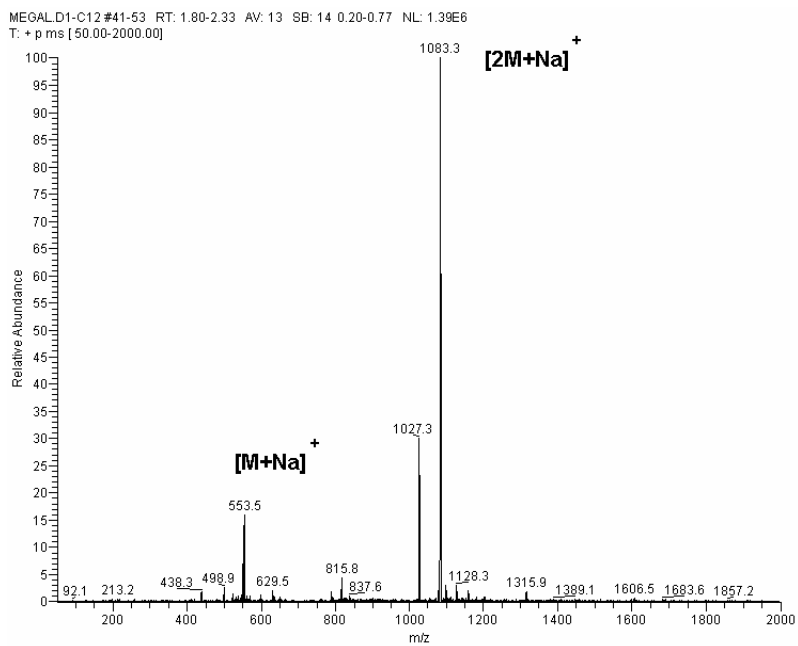
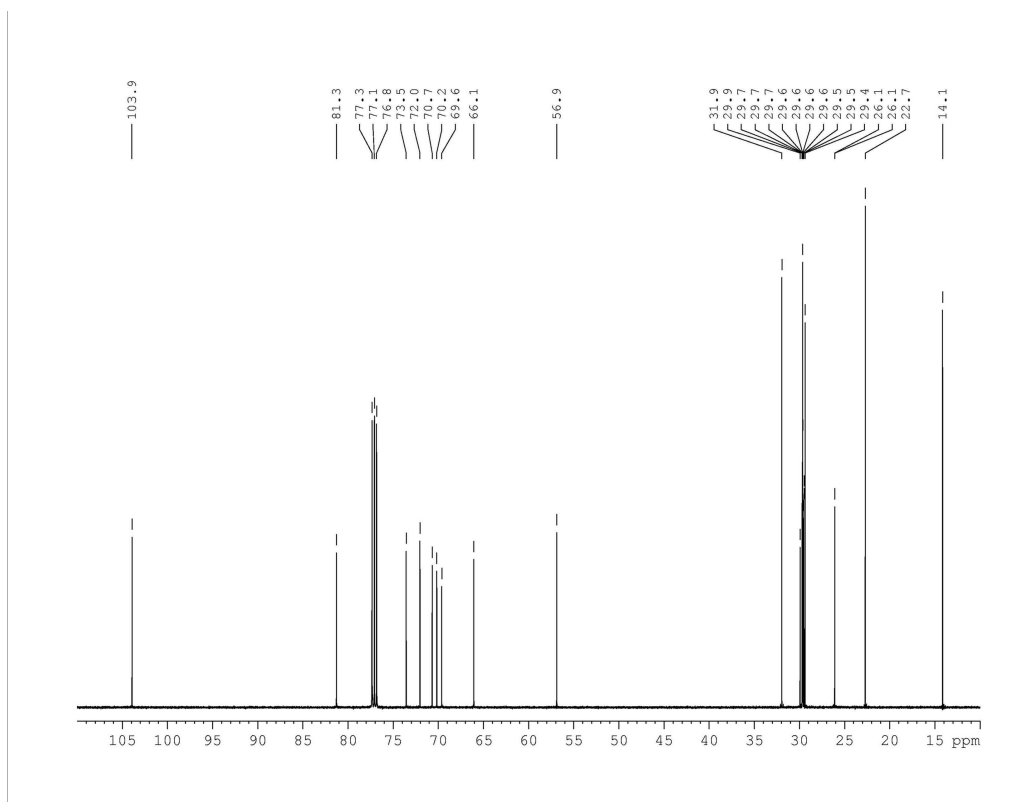


Composto **5e**: Metil 3,6-di-*O*-dodecil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

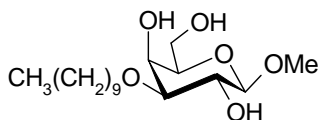


- Xarope incolor  $[\alpha]_D^{23} +1,7^0$  (c 0,8,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_F$  0,57 (hexanes:ethyl acetate, 3:2);  $^1\text{H}$  NMR (ppm) 0,88 (t, 6H, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,33-1,23 (b, 36H, 2 x  $(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ ), 1,58 (m, 2H, C-6 $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 1,63 (m, 2H, C-3 $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 2,35 (b, 1H, OH-2), 2,46 (b, 1H, OH-4), 3,28 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 9,5$ ,  $J_{3,4} = 3,4$ ), 3,51 (m, 2H, C-6O- $\text{CH}_2$ ), 3,55 (m, 1H, C-3OCH), 3,56 (b, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,57 (b, 1H, H-5), 3,67 (m, 2H, C-3OCH'), 3,68 (m, 1H, H-6), 3,70 (m, 1H, H-2), 3,78 (m, 1H, H-6), 4,05 (b, 1H, H-4), 4,19 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7,8$ );  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  14,1 (2C, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22,7 (2C, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 26,1 (2C, 2 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 29,4-29,7 (12C, 2 x  $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 29,6 (1C, C-6 $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 29,9 (1C, C-3 $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 31,9 (2C, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 56,9 (1C,  $\text{OCH}_3$ ), 66,1 (1C, C-4), 69,6 (1C, C-6), 70,2 (1C, C-3 $\text{OCH}_2$ ), 70,7 (1C, C-2), 72,0 (1C, C-3 $\text{OCH}_2$ ), 73,5 (1C, C-5), 81,3 (1C, C-3), 103,9 (1C, C-1). ESIMS:  $m/z$  554 [M+Na],  $m/z$  1083 [2M+Na]

## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **5e**

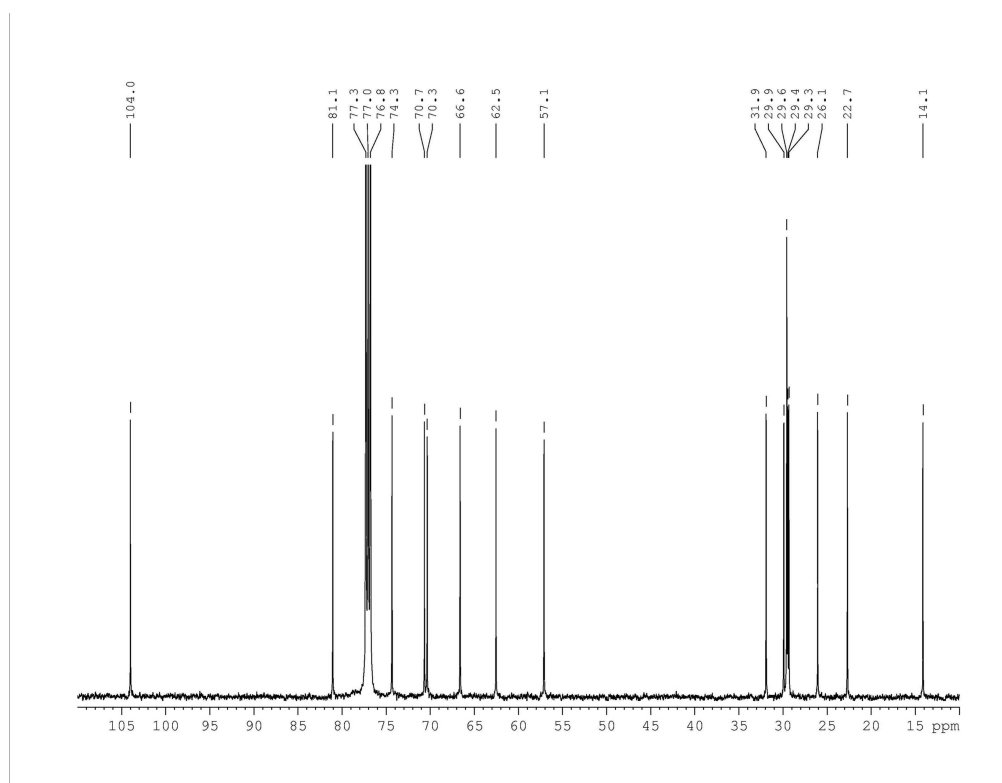


Composto **5f**: Metil 3-*O*-decil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

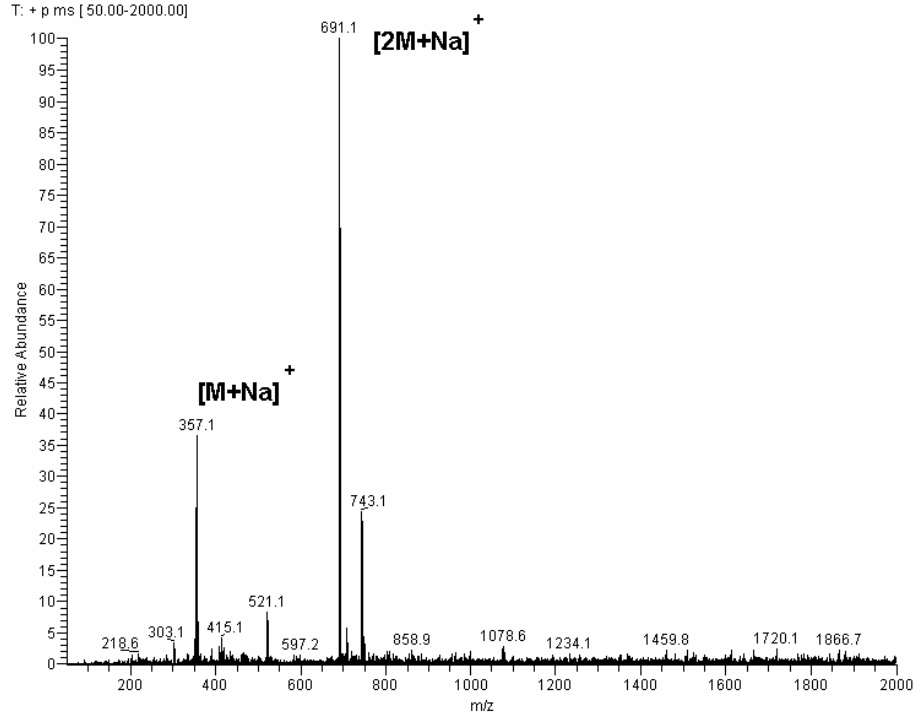


- Pó branco a partir de recristalização em hexanes, mp 84-86 °C;  $[\alpha]_D^{23} +8,6^\circ$  (c 0,5, CHCl<sub>3</sub>),  $R_F$  0,31 (acetato de etila); <sup>1</sup>H NMR (ppm) 0,88 (t, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,34-1,24 (b, 14H, (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>), 1,63 (p, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,30 (q, 1H, OH-6), 2,47 (b, 1H, OH-2), 2,60 (b, 1H, OH-4), 3,30 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 9,4$ ,  $J_{3,4} = 3,4$ ), 3,53 (b, 1H, H-5), 3,58 (b, 4H, OCH<sub>3</sub>, OCH), 3,66 (m, 1H, OCH'), 3,68 (m, 1H, H-2), 3,86 (m, 1H, H-6,  $J_{5,6} = 4,8$ ,  $J_{6,6'} = 11,6$ ,  $J_{6,OH-6} = 8,0$ ), 3,99 (m, 1H, H-6',  $J_{5,6'} = 6,4$ ,  $J_{6',OH-6} = 4,6$ ), 4,06 (b, 1H, H-4), 4,21 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7,8$ ); <sup>13</sup>C NMR (ppm) 14,1 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22,7 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 26,1 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29,3-29,6 (4C, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29,9 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31,9 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 57,1 (1C, OCH<sub>3</sub>), 62,5 (1C, C-6), 66,6 (1C, C-4), 70,3 (1C, OCH<sub>2</sub>), 70,7 (1C, C-2), 74,3 (1C, C-5), 81,1 (1C, C-3), 104,0 (1C, C-1). ESIMS:  $m/z$  357 [M+Na]<sup>+</sup>,  $m/z$  691 [2M+Na]<sup>+</sup>.

## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **5f**

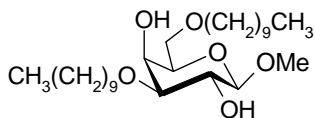


MeGALC-10 #48-67 RT: 2.18-3.03 AV: 20 SB: 29 0.07-1.35 NL: 1.22E6  
T: + p ms [ 50.00-2000.00]



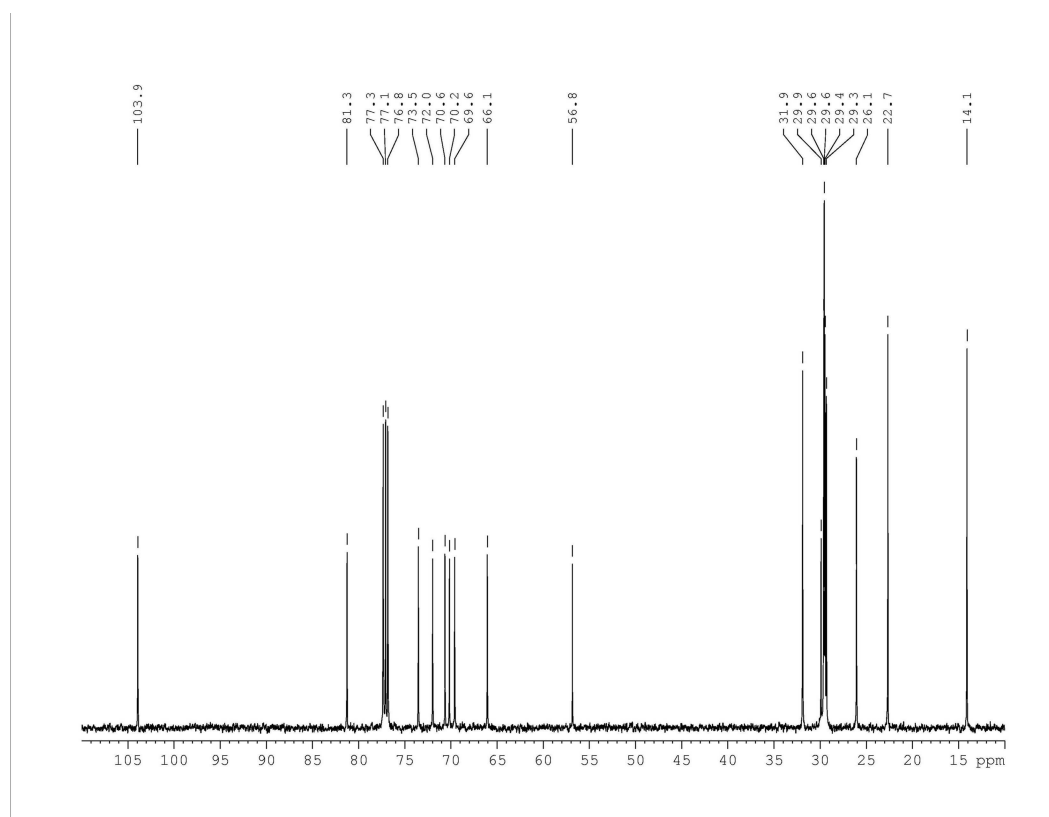


Composto **5g**: Metil 3,6-di-*O*-decil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

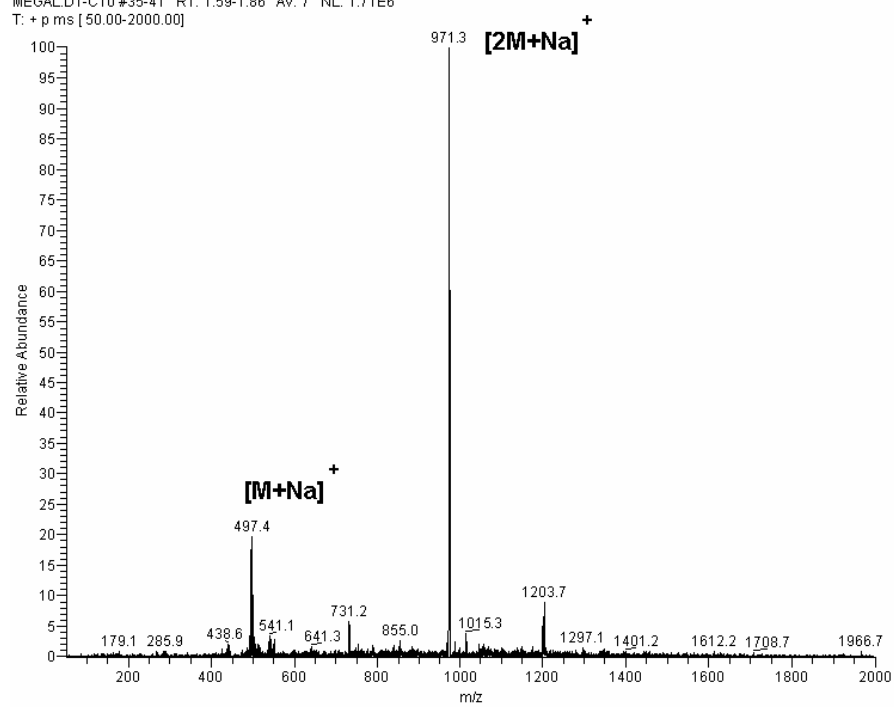


- xarope incolor;  $[\alpha]_D^{23} +1,5^\circ$  (c 0,7;  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_F$  0,54 (hexano:acetato de etila, 3:2);  $^1\text{H}$  NMR (ppm) 0,88 (t, 6H, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,34-1,23 (b, 28H, 2 x  $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 1,58 (m, 2H, C-6 $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 1,63 (m, 2H, C-3 $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 2,36 (b, 1H, OH-2), 2,46 (b, 1H, OH-4), 3,28 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 9,5$ ,  $J_{3,4} = 3,4$ ), 3,55 (m, 1H, C-3 $\text{OCH}$ ), 3,56 (b, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,57 (b, 3H, H-5, C-6 $\text{O}-\text{CH}_2$ ), 3,67 (m, 2H, C-3 $\text{OCH}$ ), 3,68 (m, 1H, H-6), 3,69 (m, 1H, H-2), 3,77 (m, 1H, H-6), 4,05 (b, 1H, H-4), 4,19 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7,8$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (ppm) 14,1 (2C, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22,7 (2C, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 26,1 (2C, 2 x  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 29,3-29,6 (8C, 2 x  $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 29,6 (1C, C-6 $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 29,9 (1C, C-3 $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 31,9 (2C, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 56,9 (1C,  $\text{OCH}_3$ ), 66,1 (1C, C-4), 69,6 (1C, C-6), 70,2 (1C, C-3 $\text{OCH}_2$ ), 70,7 (1C, C-2), 72,1 (1C, C-3 $\text{OCH}_2$ ), 73,6 (1C, C-5), 81,3 (1C, C-3), 103,9 (1C, C-1). ESIMS:  $m/z$  497  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  971  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

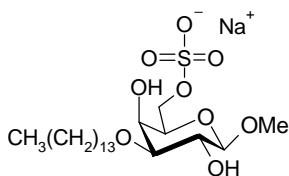
# Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **5g**



MEGALD1-C10 #35-41 RT: 1.59-1.86 AV: 7 NL: 1.71E6  
T: + p ms [50.00-2000.00]

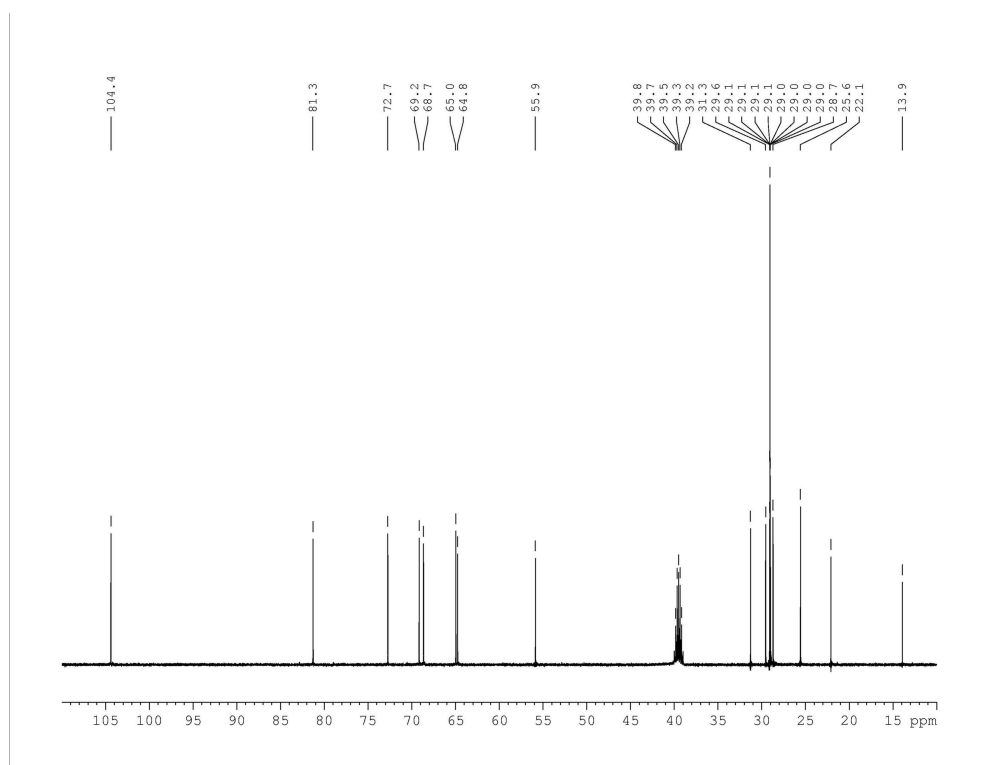


Composto **5b2**: Metil 3-*O*-tetradecil- $\beta$ -D-galactopiranosse 6-sulfato, sal sódico

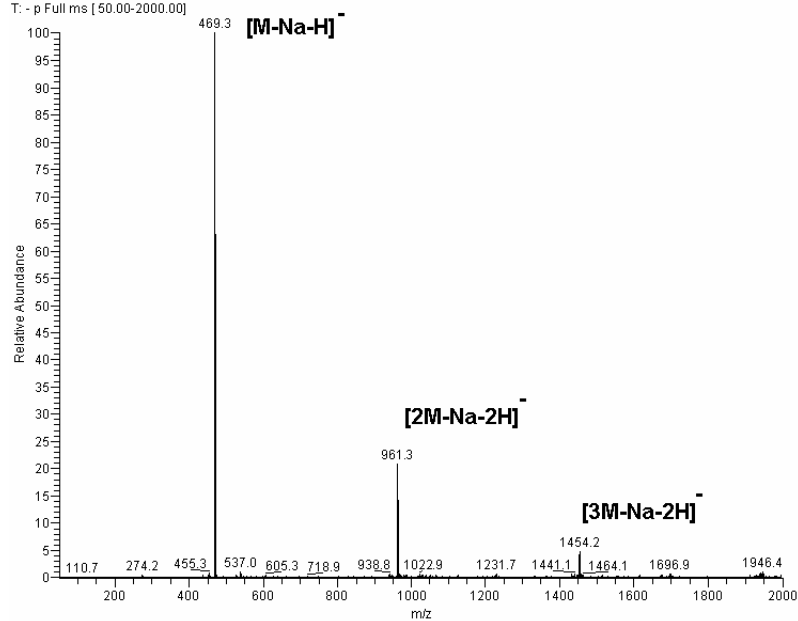


- Cubos incolores a partir de hexano/acetato de etila (4:1), mp 120-125 °C;  $[\alpha]_D^{23} +12,0$  (c, 0,9 CH<sub>3</sub>OH),  $R_F$  0,24 (acetato de etila/metanol/água - 24:2:1); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): (ppm) 0,85 (t, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,34-1,18 (b, 22H, (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>), 1,49 (p, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3,05 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  9,6 Hz,  $J_{3,4}$  3,2 Hz, H-3), 3,33 (b, 1H, H-2), 3,36 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 3,37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) 3,52 (m, 1H, H-5), 3,55 (m, 1H, OCH'), 3,80 (m, 2H, H-4, H-6), 3,86 (m, 1H, H-6'), 4,00 (d, 1H,  $J_{1,2}$  7,8 Hz, H-1); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): (ppm) 13,9 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22,1 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25,6 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28,7-29,1 (8C, 8x CH<sub>2</sub>), 29,6 (1C, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31,3 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55,9 (1C, OCH<sub>3</sub>), 64,8 (1C, C-4), 65,0 (1C, C-6), 68,7 (1C, OCH<sub>2</sub>), 69,2 (1C, C-2), 72,8 (1C, C-5), 81,3 (1C, C-3), 104,4 (1C, C-1); ESIMS:  $m/z$  469 [M-Na-H],  $m/z$  961 [2M-Na-2H]<sup>+</sup>,  $m/z$  1454 [3M-Na-2H]<sup>+</sup>.

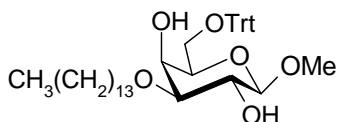
## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **5b2**



MeGAL C-14S #38-50 RT: 1.53-1.98 AV: 13 NL: 1.95E7  
T: - p Full ms [50.00-2000.00]

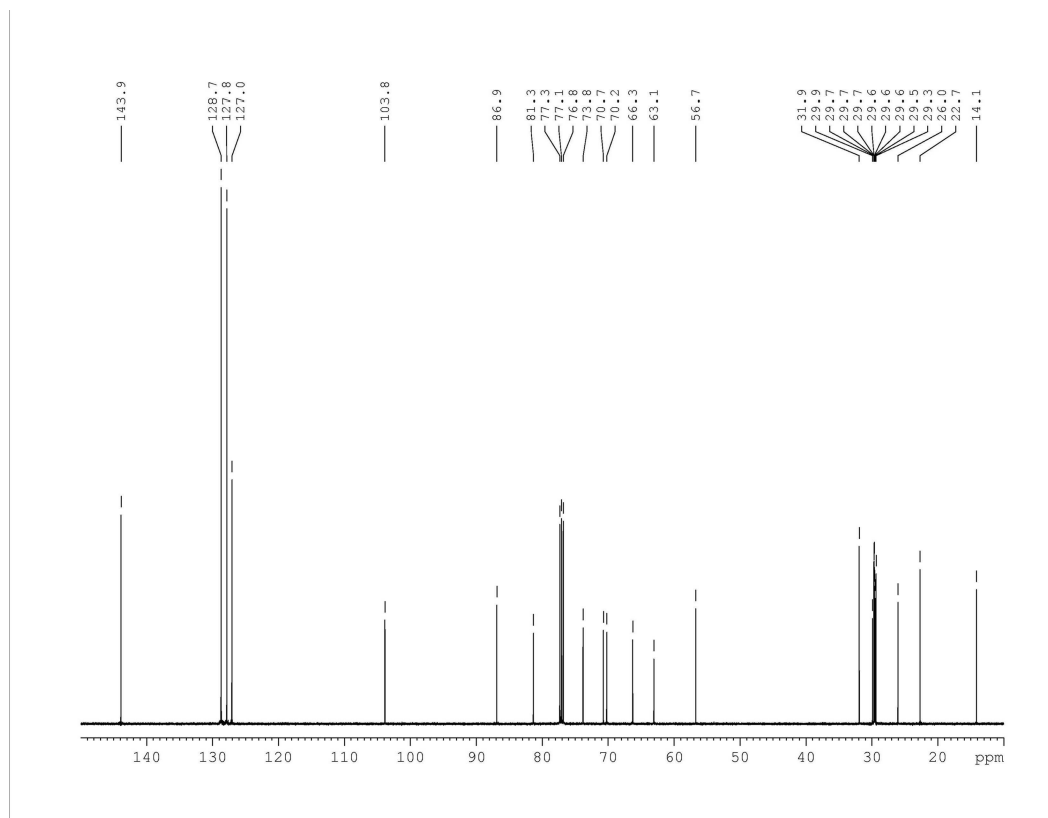


Composto **6b**: Metil 3-*O*-tetradecil-6-*O*-tritol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

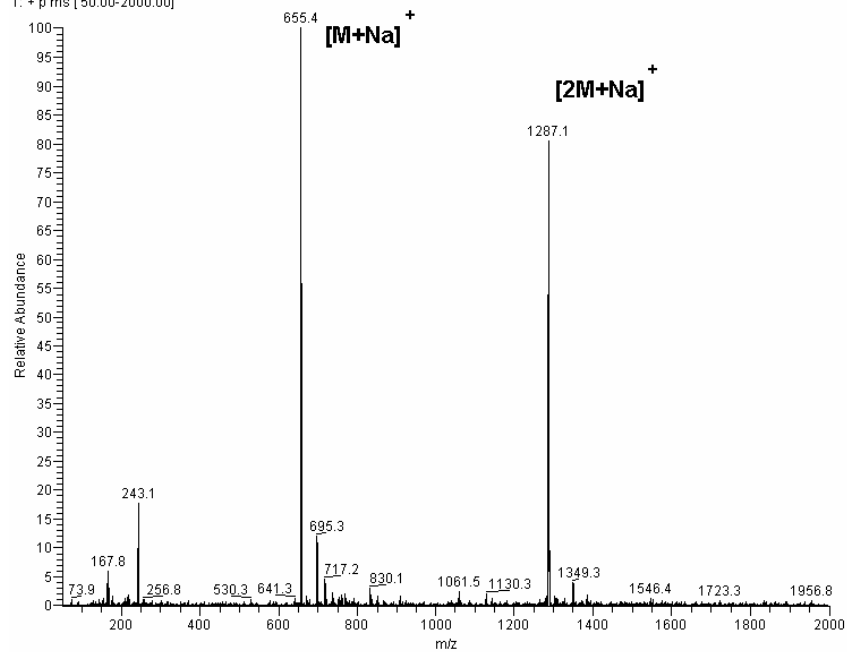


- Xarope incolor;  $[\alpha]_D^{23} -8,6^\circ$  (c 1,3;  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_F$  0,62 (hexano:acetato de etila, 3:2);  $^1\text{H}$  NMR (ppm) 0,88 (t, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,36-1,23 (b, 22H,  $(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ ), 1,62 (p, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 2,41 (b, 1H, OH-2), 2,31 (b, 1H, OH-4), 3,25 (dd, 1H, H-3,  $J_{2,3} = 9,4$ ,  $J_{3,4} = 3,3$ ), 3,40 (m, 1H, H-6), 3,48 (m, 1H, H-6'), 3,51 (b, 1H, H-5), 3,54 (b, 1H, OCH), 3,57 (b, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,65 (m, 1H, OCH'), 3,68 (m, 1H, H-2), 4,03 (b, 1H, H-4), 4,17 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7,8$ ), 7,22 (b, 3H, 3 x Ar-CHCHCH), 7,29 (b, 6H, 6 x Ar-CHCHCH), 7,47 (b, 6H, 6 x Ar-CCHCH);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  14,1 (1C,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22,7 (1C,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 26,0 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 29,3-29,7 (8C,  $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 29,9 (1C,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 31,9 (1C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 56,7 (1C,  $\text{OCH}_3$ ), 63,1 (1C, C-6), 66,2 (1C, C-4), 70,2 (1C,  $\text{OCH}_2$ ), 70,8 (1C, C-2), 73,8 (1C, C-5), 81,3 (1C, C-3), 86,9 (1C,  $\text{OCPh}_3$ ) 103,8 (1C, C-1), 127,1 (3C, 3 x Ar-CHCHCH), 127,9 (6C, 6 x Ar-CHCHCH), 128,7 (6C, 6 x Ar-CCHCH), 143,9 (3C, 3 x Ar-CCCH). ESI MS:  $m/z$  655  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  1287  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

# Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **6b**



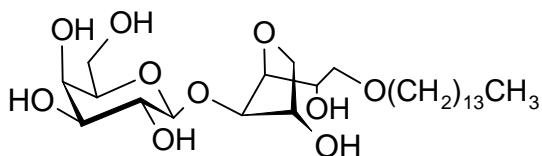
MEGALC14 TRITYL#35-39 RT: 1.60-1.81 AV: 5 SB: 20 0.55-1.41 NL: 2.44E5  
T: + p ms [ 50.00-2000.00]



## **ANEXO 2**

**Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e ESIMS dos derivados obtidos a partir dos oligossacarídeos alditóis (numeração de acordo com a Figura 77).**

Composto 10:  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH

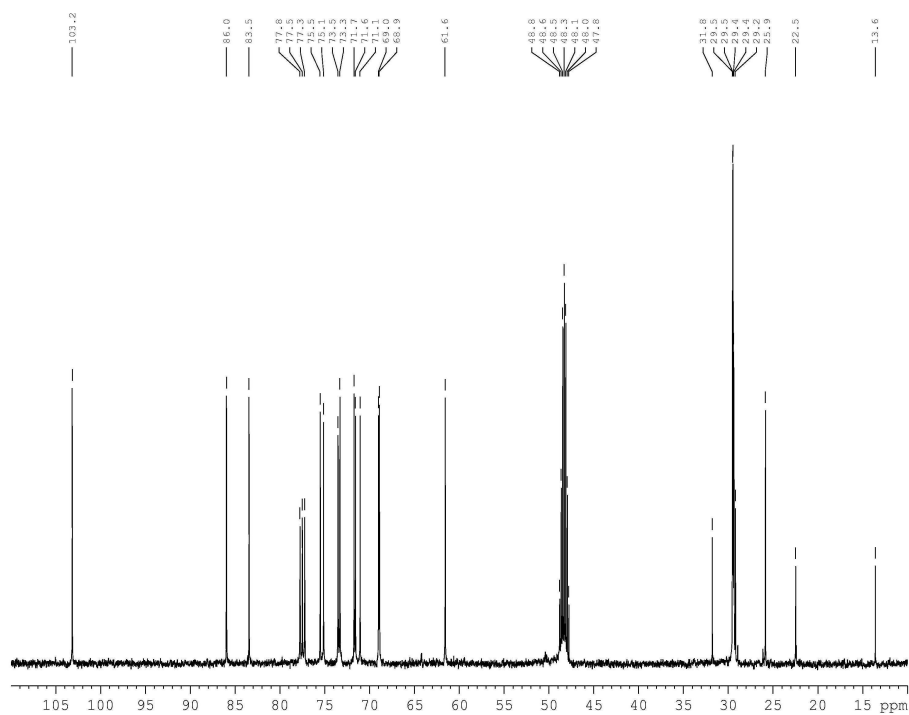


- $\beta$ -D-Galp:  $^1\text{H}$  (ppm) 4,40 (H-1); 3,56 (H-2); 3,50 (H-3); 3,85 (H-4); 3,54 (H-5); 3,83 (H-6'); 3,73 (H-6).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 103,2 (C-1); 71,1 (C-2); 73,5 (C-3); 68,9 (C-4); 75,5 (C-5); 61,5 (C-6).
- 3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH:  $^1\text{H}$  (ppm) 3,53 (H-1, H-1'); 4,00 (H-2); 4,01 (H-3); 4,28 (H-4); 4,28 (H-5); 3,95 (H-6'); 3,81 (H-6); 3,41 e 3,54 ( $\text{OCH}_2$ ); 1,10-1,50 ( $\text{CH}_2$ ); 0,85 ( $\text{CH}_3$ ).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 71,7 (C-1); 69,0 (C-2); 83,5 (C-3); 85,9 (C-4); 75,1 (C-5); 73,3 (C-6), 71,5 ( $\text{OCH}_2$ ); 31,8-22,5 ( $\text{CH}_2$ ); 13,6 ( $\text{CH}_3$ ).

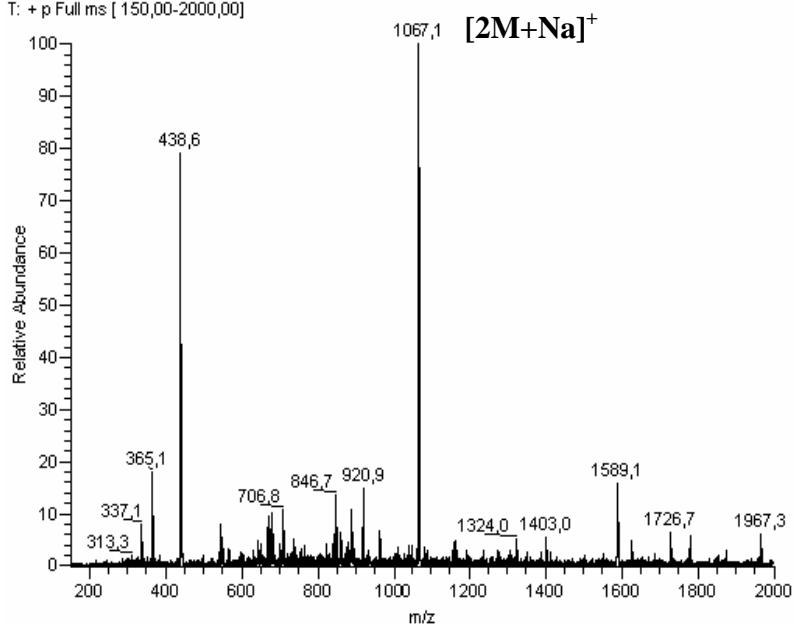
ESIMS:  $m/z$  1067  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .



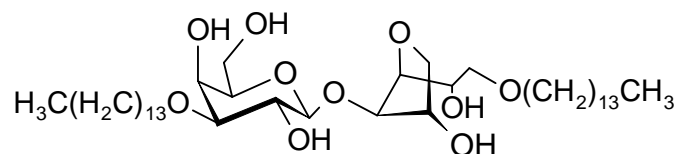
## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **10**



AGR 1-ALKYL #50-51 RT: 2,51-2,57 AV: 2 NL: 9,95E4  
T: + p Full ms [ 150,00-2000,00]



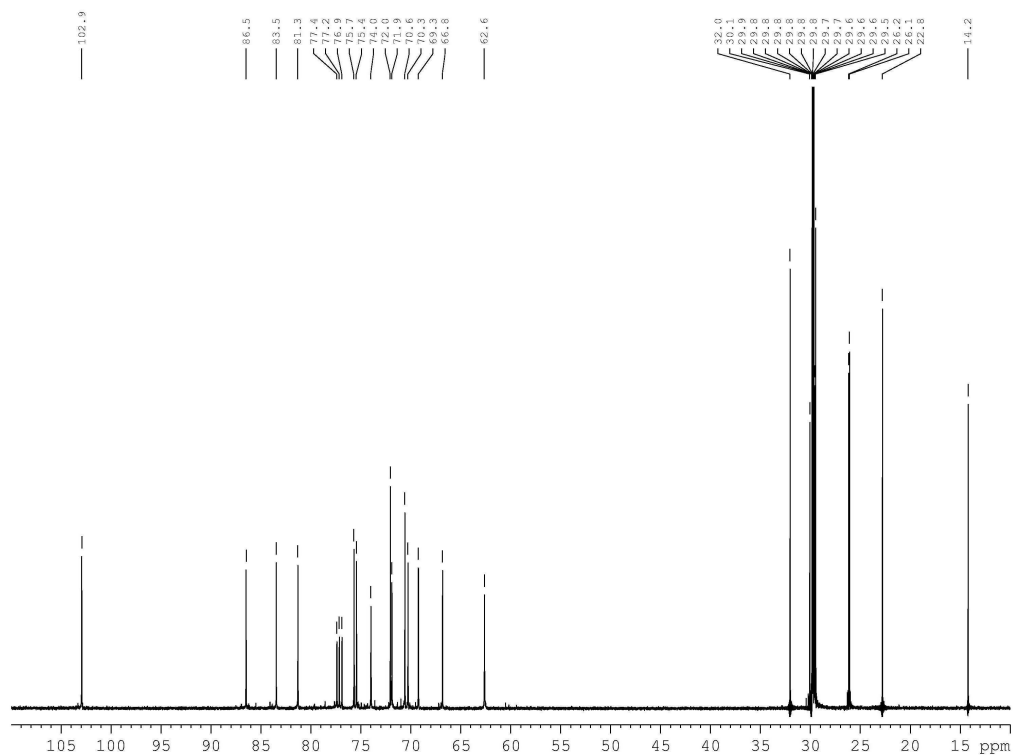
**Composto 11: 3-O-tetradecil-β-D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH**



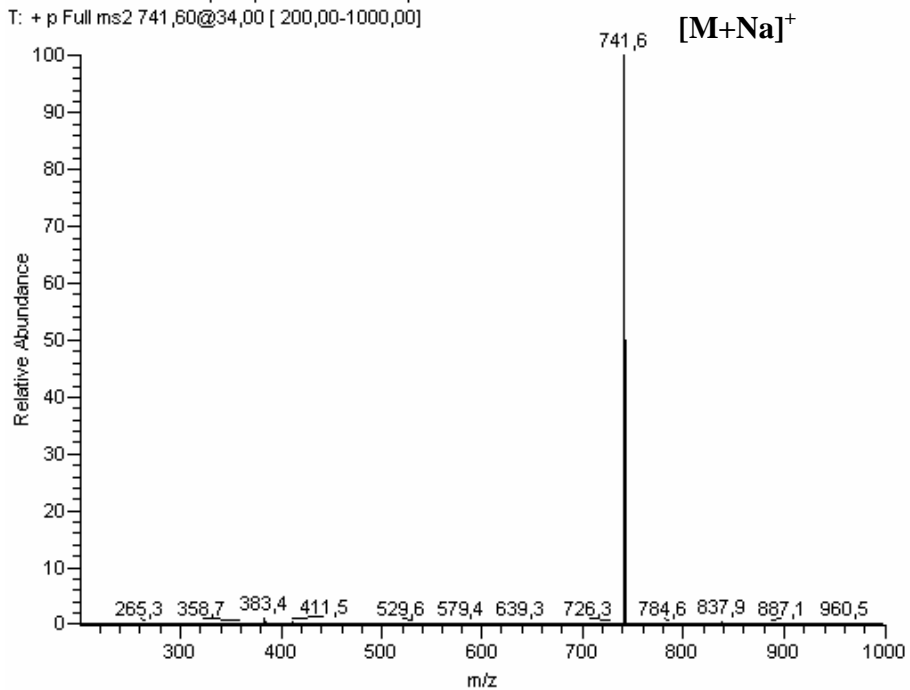
- 3-O-tetradecil-β-D-Galp:  $^1\text{H}$  (ppm) 4,46 (H-1); 3,67 (H-2); 3,29 (H-3); 3,93 (H-4); 3,56 (H-5); 3,93 (H-6'); 3,72 (H-6); 3,63 e 3,56 ( $\text{OCH}_2$ ); 1,10-1,50 ( $\text{CH}_2$ ); 0,85 ( $\text{CH}_3$ ).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 102,9 (C-1); 70,3 (C-2); 81,3 (C-3); 66,8 (C-4); 75,4 (C-5); 62,6 (C-6), 70,6 ( $\text{OCH}_2$ ); 32,0-22,8 ( $\text{CH}_2$ ); 14,2 ( $\text{CH}_3$ ).
- 3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH:  $^1\text{H}$  (ppm) 3,54 e 3,46 (H-1 e H-1'); 4,06 (H-2); 4,06 (H-3); 4,31 (H-4); 4,29 (H-5); 3,91 (H-6'); 3,86 (H-6); 3,46 ( $\text{OCH}_2$ ); 1,10-1,50 ( $\text{CH}_2$ ); 0,85 ( $\text{CH}_3$ ).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 71,9 (C-1); 69,3 (C-2); 83,5 (C-3); 86,5 (C-4); 75,7 (C-5); 74,0 (C-6), 72,0 ( $\text{OCH}_2$ ); 31,8-22,5 ( $\text{CH}_2$ ); 13,6 ( $\text{CH}_3$ ).

ESIMS:  $m/z$  741  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

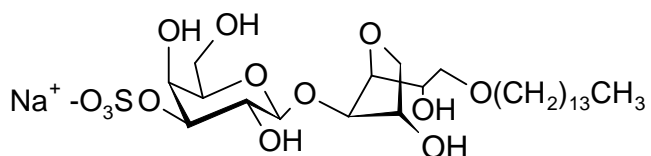
## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **11**



AGR FDi #86-93 RT: 2,05-2,18 AV: 8 NL: 5,16E6  
T: + p Full ms2 741,60@34,00 [ 200,00-1000,00]



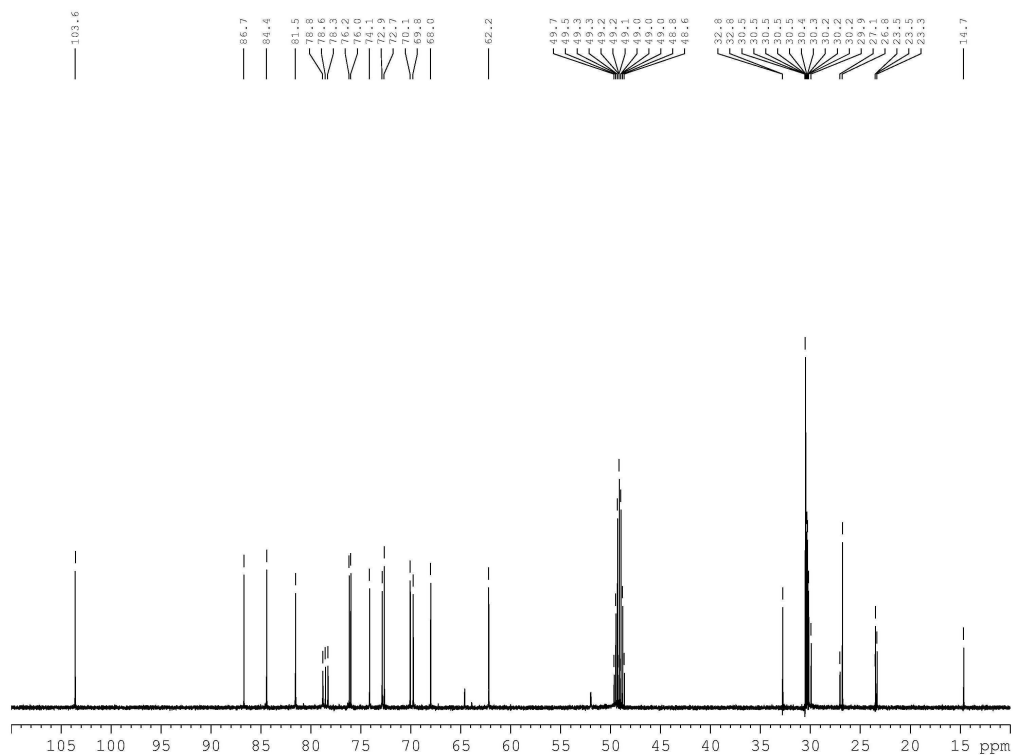
**Composto 12:  $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH, sal sódico**



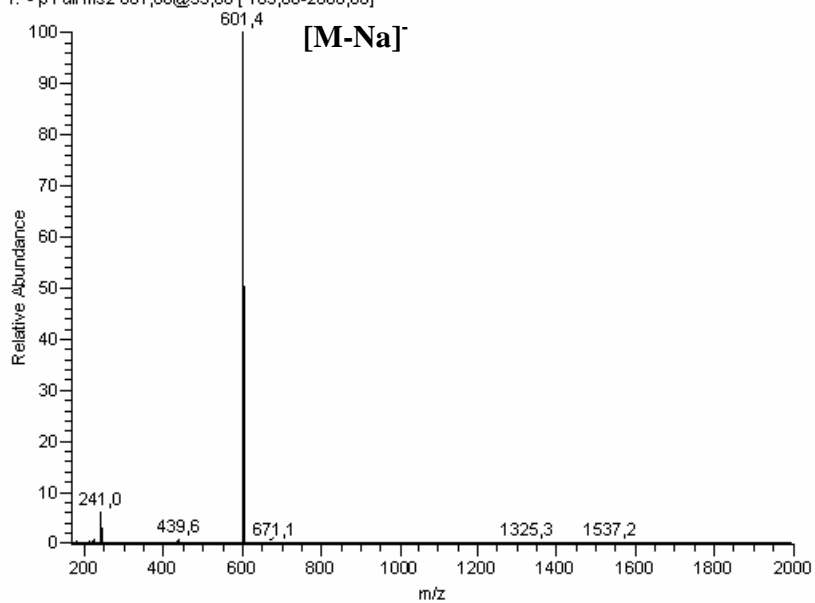
- $\beta$ -D-Galp 3-sulfato:  $^1\text{H}$  (ppm) 4,55 (H-1); 3,70 (H-2); 4,26 (H-3); 3,79 (H-6'); 3,73 (H-6).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 103,6 (C-1); 70,1 (C-2); 81,6 (C-3); 62,2 (C-6).
- 3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH:  $^1\text{H}$  (ppm) 3,92 (H-3); 4,31 (H-4).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 84,4 (C-3); 86,7 (C-4); 32,8-23,3 ( $\text{CH}_2$ ); 14,7 ( $\text{CH}_3$ ).

ESIMS:  $m/z$  601  $[\text{M}-\text{Na}]^-$

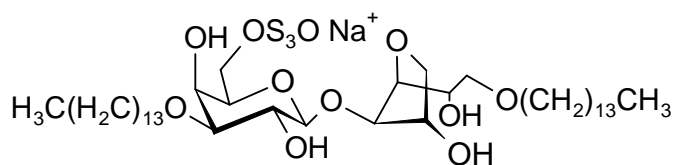
## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **12**



AGR 1 ALK3S #111-115 RT: 3,13-3,25 AV: 5 NL: 1,28E7  
T: - p Full ms2 601,00@35,00 [ 165,00-2000,00]



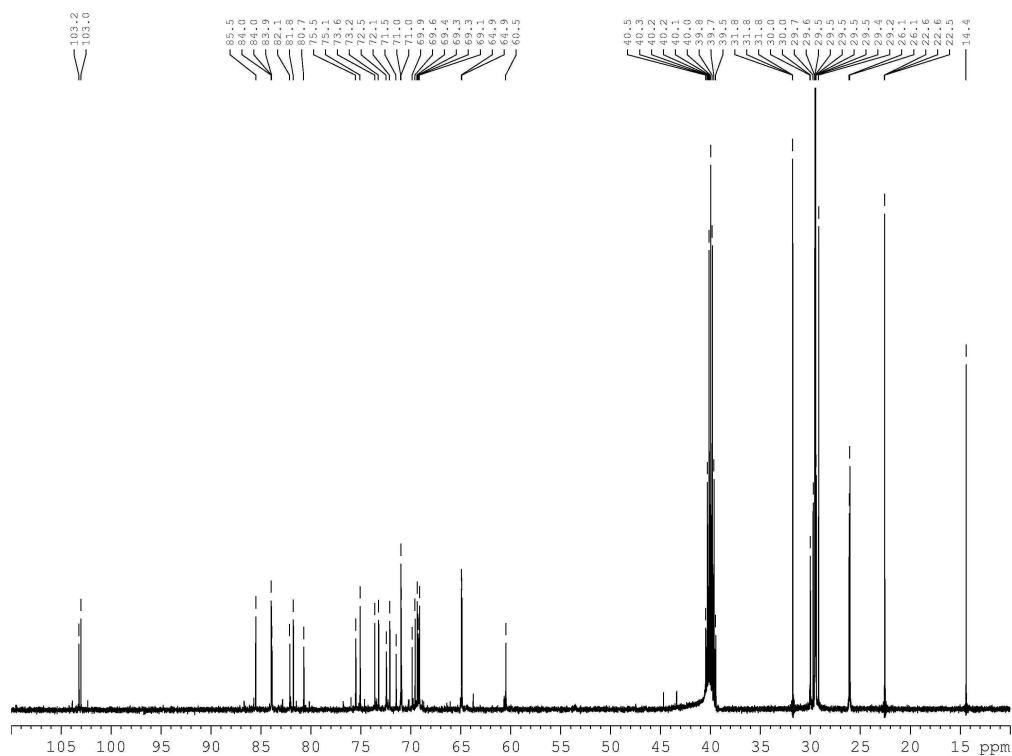
Composto 13: 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp 6-O-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH, sal sódico\*



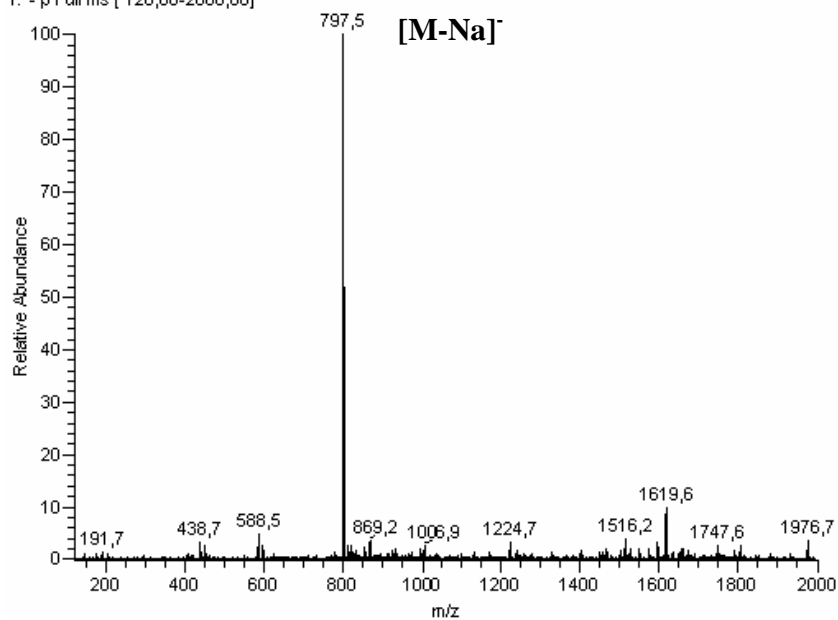
\*Composto majoritário. De acordo com o espectro de ESIMS, o composto contaminante é um isômero do composto principal

ESIMS:  $m/z$  797  $[\text{M}-\text{Na}]^-$

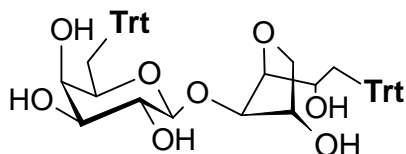
# Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **13**



AGR Di S #60-65 RT: 1,67-1,81 AV: 6 NL: 2,80E6  
T: - p Full ms [ 120,00-2000,00]



Composto 14: 6-*O*-tritol- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-*O*-tritol-L-GalOH

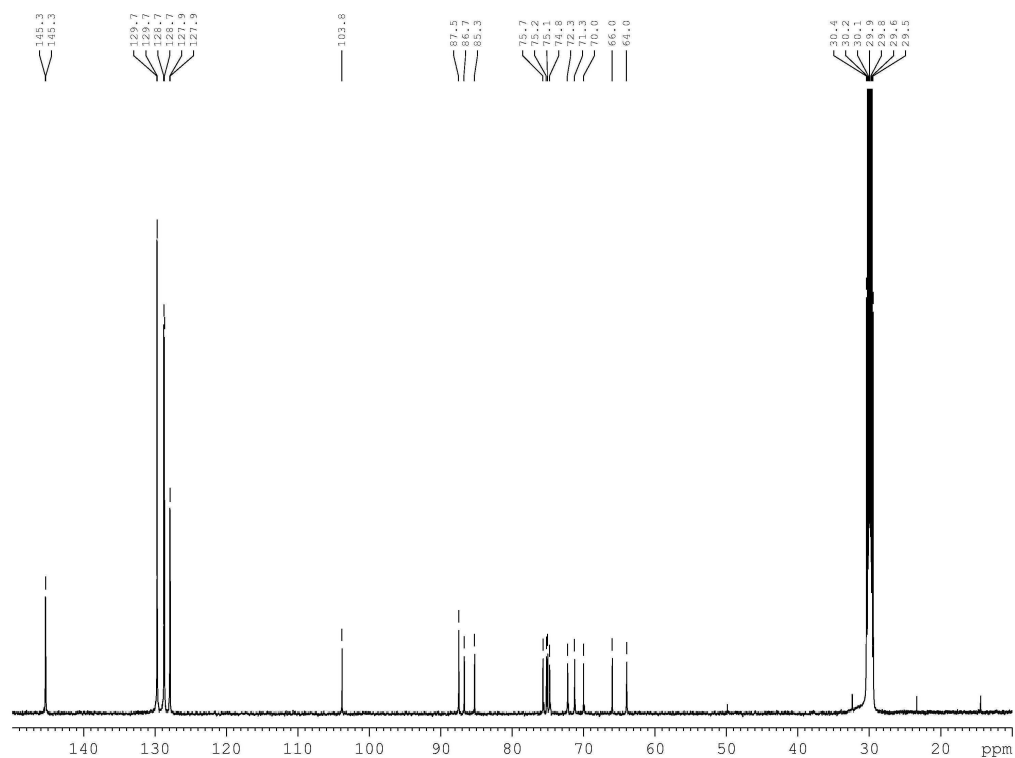


- 6-*O*-tritol- $\beta$ -D-Galp:  $^1\text{H}$  (ppm) 4,40 (H-1); 3,61 (H-2); 3,61 (H-3); 3,98 (H-4); 3,68 (H-5); 3,44 (H-6'); 3,39 (H-6); 7,20-7,50 (Ar).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 103,8 (C-1); 72,1 (C-2); 74,7 (C-3); 70,0 (C-4); 74,9 (C-5); 63,9 (C-6); 87,4 (C\*); 145,3-127,9 (Ar).
- 3,6-An-1-*O*-tritol-L-GalOH:  $^1\text{H}$  (ppm) 3,18 (H-1, H-1'); 4,03 (H-2); 4,13 (H-3); 4,38 (H-4); 4,17 (H-5); 3,86 (H-6'); 3,72 (H-6); 7,20-7,50 (Ar).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 66,0 (C-1); 71,2 (C-2); 85,2 (C-3); 86,8 (C-4); 76,7 (C-5); 75,1 (C-6); 87,5 (C\*); 145,3-127,9 (Ar).

ESIMS:  $m/z$  833  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  1644  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

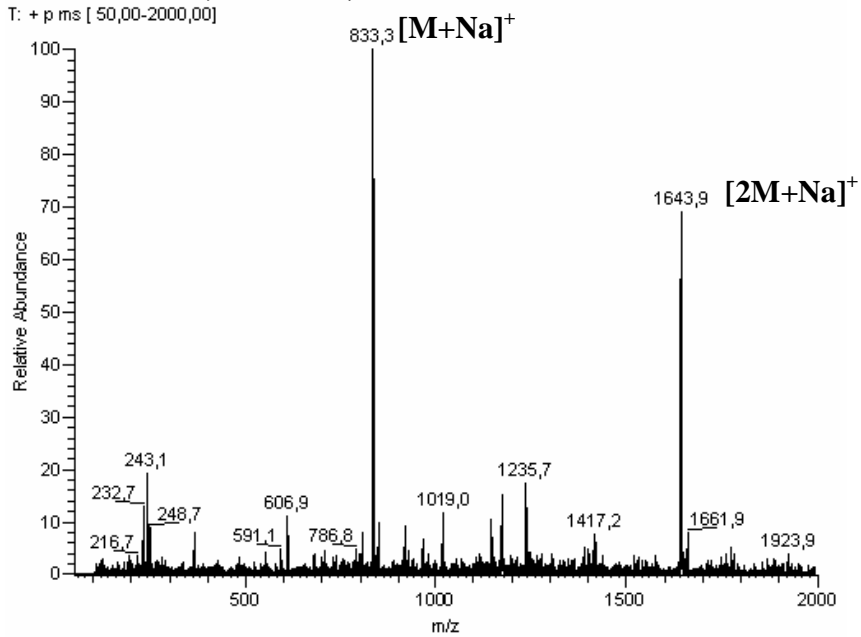


# Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **14**

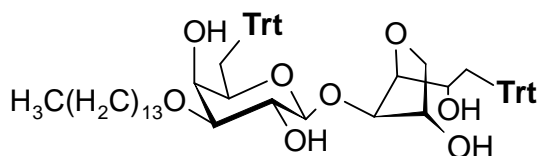


Bis-TRT-AGR #42 RT: 1,84 AV: 1 NL: 4,26E6

T: + p ms [ 50,00-2000,00]



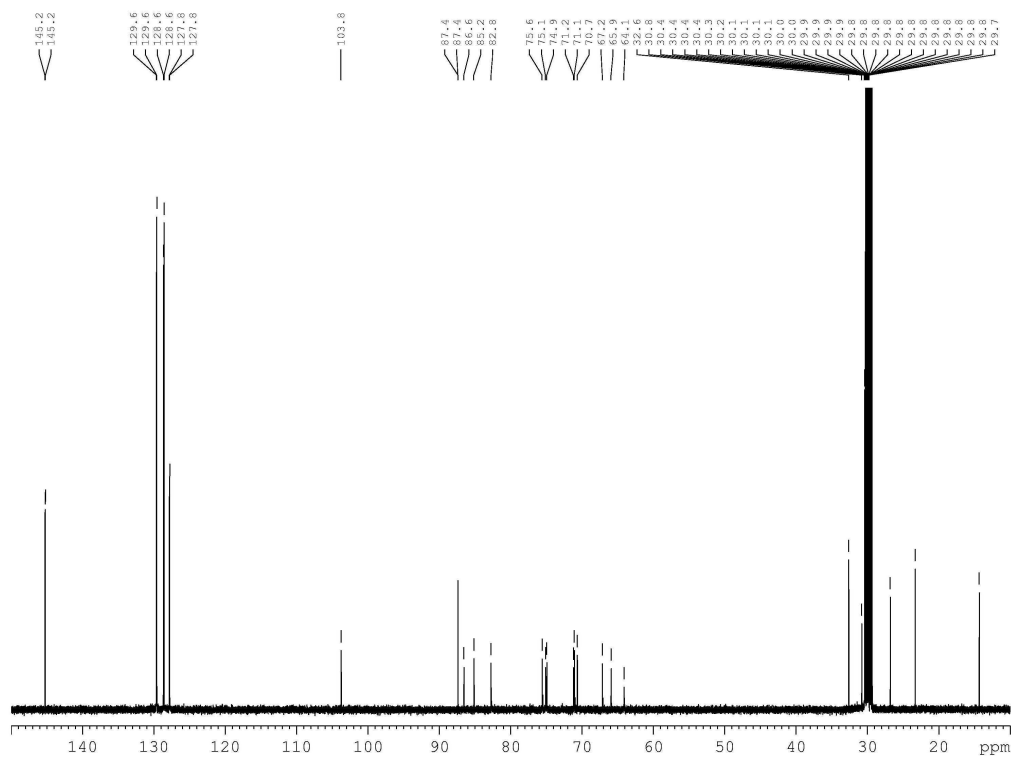
**Composto 15: 3-O-tetradecil-6-O-tritil-β-D-Galp-(1→4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH**



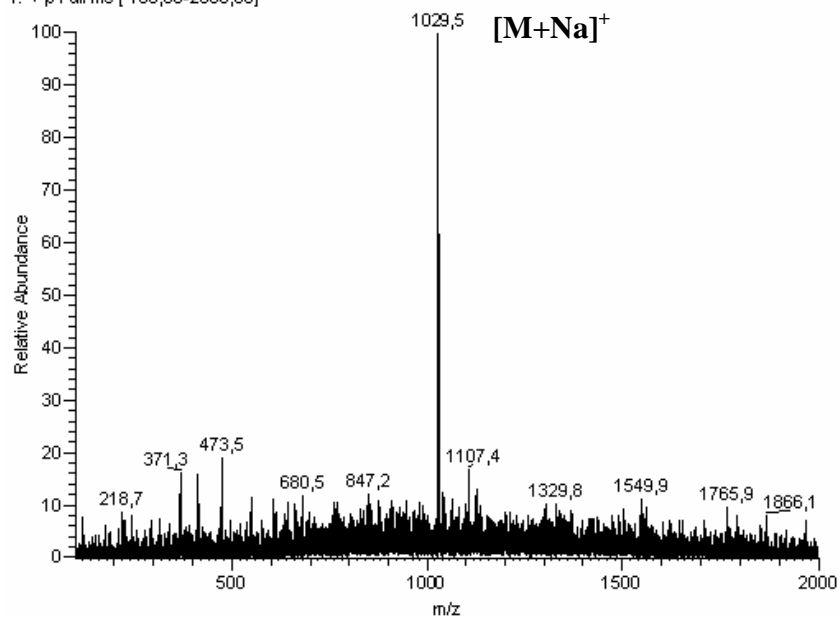
- 3-O-tetradecil-6-O-tritil-β-D-Galp:  $^1\text{H}$  (ppm) 4,46 (H-1); 3,61 (H-2); 3,31 (H-3); 4,07 (H-4); 3,67 (H-5); 3,46 (H-6'); 3,35 (H-6); 3,70 e 3,59 ( $\text{OCH}_2$ ); 1,10-1,50 ( $\text{CH}_2$ ); 0,85 ( $\text{CH}_3$ ), 7,20-7,50 (Ar).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 103,8 (C-1); 71,1 (C-2); 82,8 (C-3); 67,2 (C-4); 74,9 (C-5); 64,1 (C-6); 87,4 ( $\text{C}^*$ ); 145,3-127,9 (Ar); 70,7 ( $\text{OCH}_2$ ), 32,6-23,0 ( $\text{CH}_2$ ), 13,1 ( $\text{CH}_3$ ).
- 3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH:  $^1\text{H}$  (ppm) 3,18 (H-1, H-1'); 4,05 (H-2); 4,15 (H-3); 4,40 (H-4); 4,18 (H-5); 3,86 (H-6'); 3,72 (H-6); 7,20-7,50 (Ar).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 65,9 (C-1); 71,2 (C-2); 85,2 (C-3); 86,6 (C-4); 75,6 (C-5); 75,1 (C-6); 87,4 ( $\text{C}^*$ ); 145,3-127,9 (Ar).

ESIMS:  $m/z$  1029  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

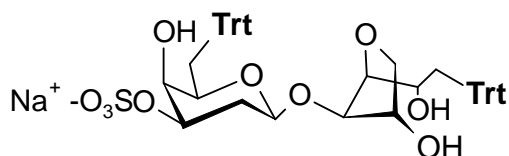
# Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **15**



AGR-Bis\_Trt\_ALK #47 RT: 2,04 AV: 1 NL: 4,42E5  
T: + p Full ms [ 100,00-2000,00]



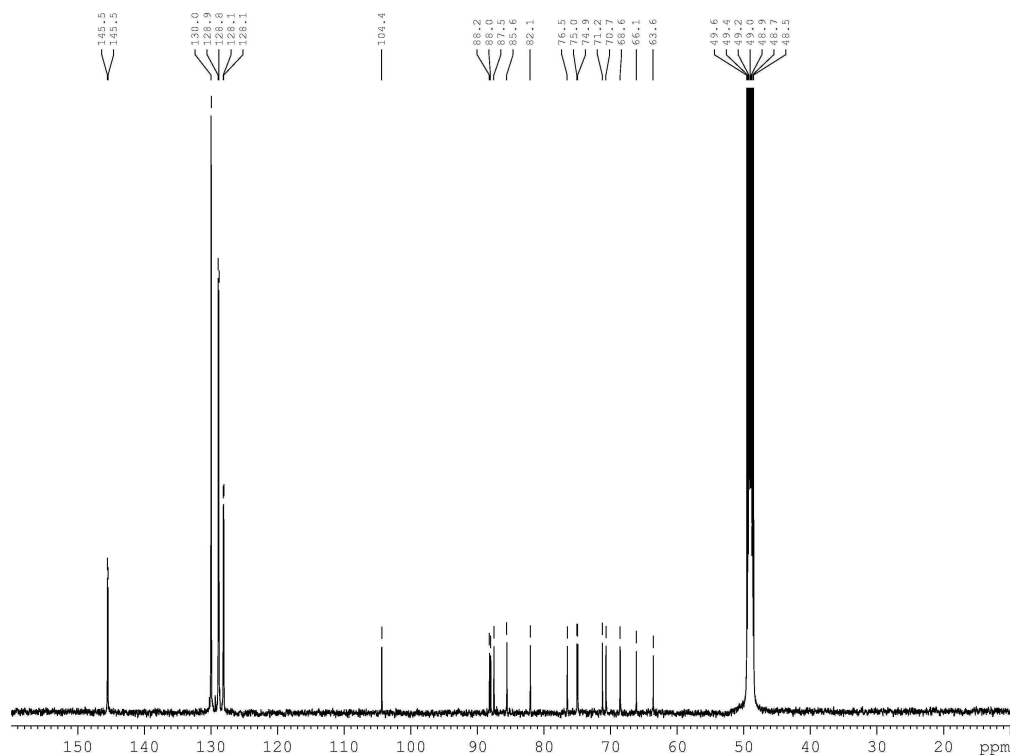
Composto **16**: **6-O-tritil-β-D-Galp 3-sulfato 1→4)-3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH**



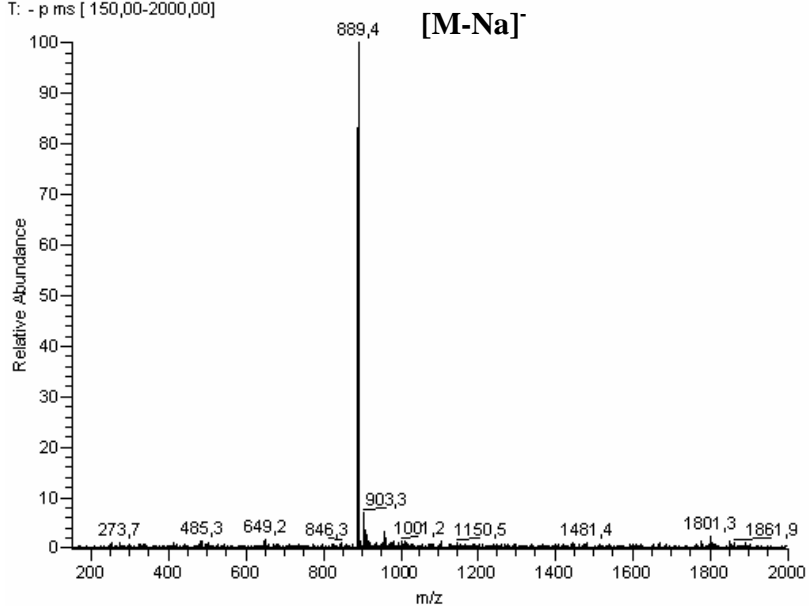
- 6-O-tritil-β-D-Galp 3-sulfato: <sup>1</sup>H (ppm) 4,45 (H-1); 3,70 (H-2); 4,22 (H-3); 4,34 (H-4); 3,54 (H-5); 3,40 (H-6'); 3,40 (H-6); 7,20-7,50 (Ar).  
<sup>13</sup>C (ppm) 104,4 (C-1); 70,7 (C-2); 82,1 (C-3); 68,6 (C-4); 75,0 (C-5); 63,3 (C-6); 88,2 (C\*); 145,5-128,1 (Ar).
- 3,6-An-1-O-tritil-L-GalOH: <sup>1</sup>H (ppm) 3,13 (H-1, H-1'); 3,93 (H-2); 4,08 (H-3); 4,27 (H-4); 4,24 (H-5); 3,90 (H-6'); 3,76 (H-6); 7,20-7,50 (Ar).  
<sup>13</sup>C (ppm) 66,1 (C-1); 71,2 (C-2); 85,6 (C-3); 87,5 (C-4); 76,7 (C-5); 76,5 (C-6), 88,0 (C\*); 145,5-128,1 (Ar).

ESIMS: *m/z* 889 [M-Na]<sup>-</sup>

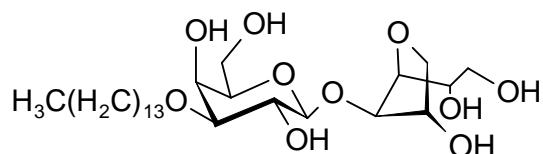
## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **16**



AGR-Bis-trt-S-F0 #77-80 RT: 2,11-2,19 AV: 4 NL: 2,93E6  
T: - p ms [ 150,00-2000,00]



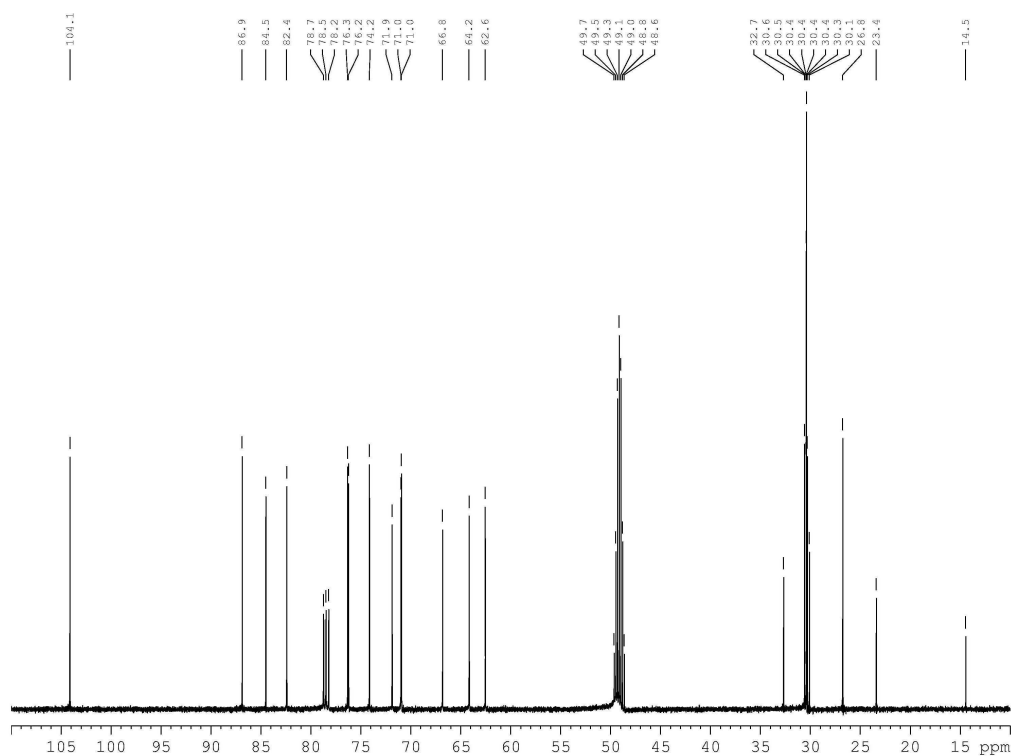
Composto 17: 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH



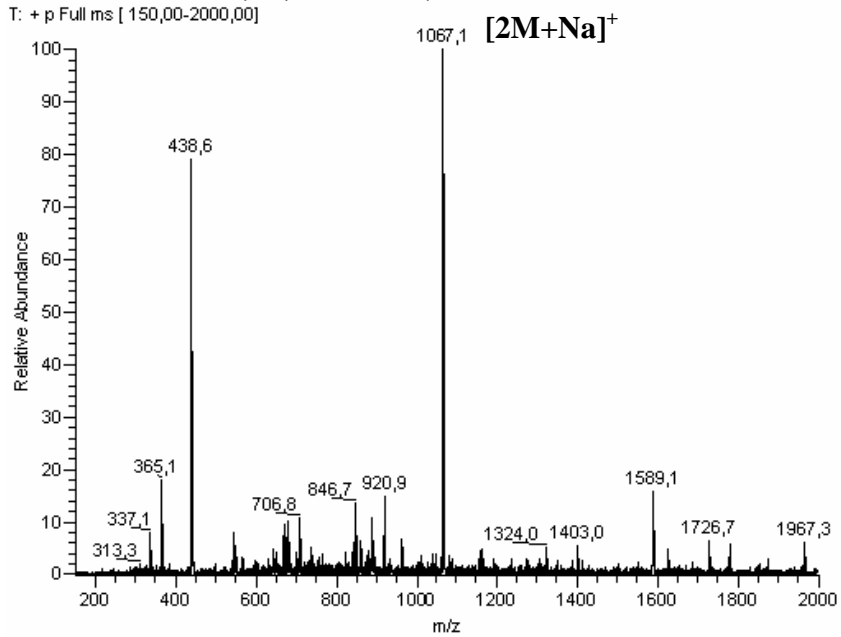
- 3-O-tetradecil- $\beta$ -D-Galp:  $^1\text{H}$  (ppm) 4,42 (H-1); 3,61 (H-2); 3,24 (H-3); 4,01 (H-4); 3,51 (H-5); 3,83 (H-6'); 3,35 (H-6); 3,69 e 3,55 ( $\text{OCH}_2$ ); 1,10-1,50 ( $\text{CH}_2$ ); 0,85 ( $\text{CH}_3$ )  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 104,1 (C-1); 71,1 (C-2); 82,4 (C-3); 66,8 (C-4); 76,3 (C-5); 62,5 (C-6); 71,0 ( $\text{OCH}_2$ ); 32,7-23,4 ( $\text{CH}_2$ ); 13,5 ( $\text{CH}_3$ ).
- 3,6-An-1-O-L-GalOH:  $^1\text{H}$  (ppm) 3,65 (H-1, H-1'); 3,89 (H-2); 4,00 (H-3); 4,28 (H-4); 4,29 (H-5); 3,94 (H-6'); 3,82 (H-6).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 64,2 (C-1); 71,9 (C-2); 84,5 (C-3); 86,9 (C-4); 76,2 (C-5); 74,1 (C-6).

ESIMS:  $m/z$  1067  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

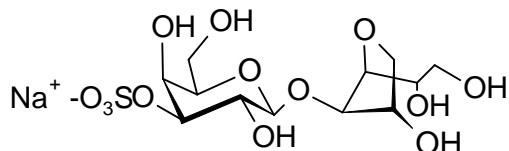
## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **17**



AGR 1-ALKYL #50-51 RT: 2,51-2,57 AV: 2 NL: 9,9E4  
T: + p Full ms [ 150,00-2000,00]



Composto 18:  $\beta$ -D-Galp 3-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-GalOH

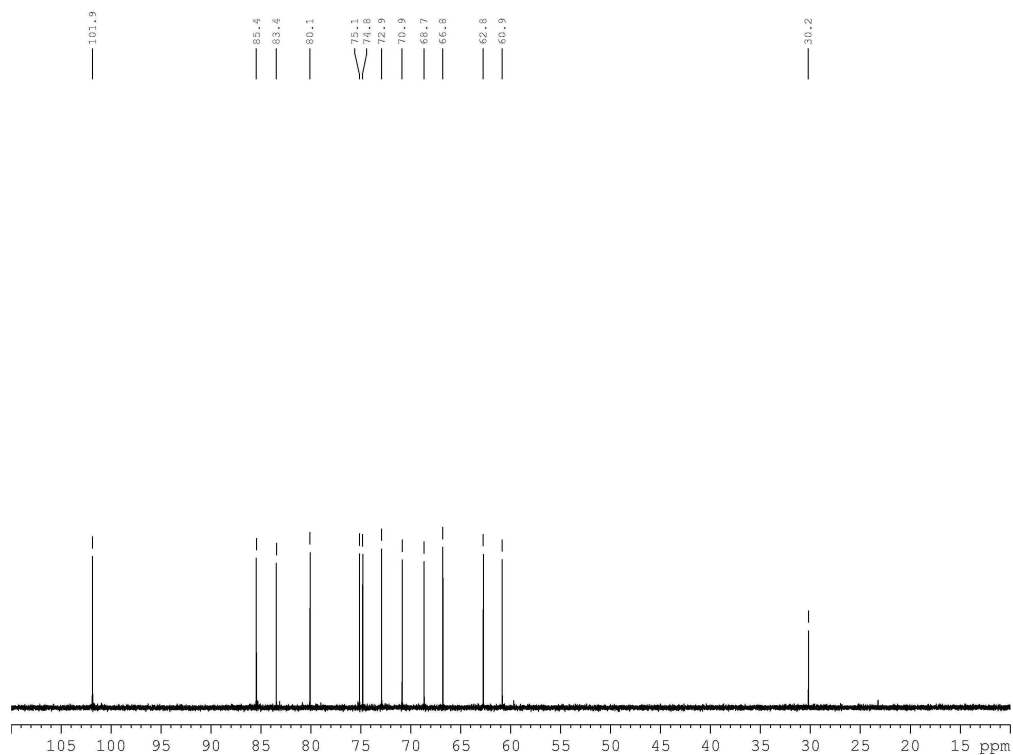


- $\beta$ -D-Galp 3-O-sulfato:  $^1\text{H}$  (ppm) 4,68 (H-1); 3,67 (H-2); 4,34 (H-3); 4,30 (H-4); 3,78 (H-5); 3,81 (H-6'); 3,79 (H-6).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 101,9 (C-1); 68,7 (C-2); 80,1 (C-3); 66,8 (C-4); 75,8 (C-5); 60,9 (C-6).
- 3,6-An-L-GalOH:  $^1\text{H}$  (ppm) 3,72 e 3,66 (H-1, H-1'); 3,93 (H-2); 3,93 (H-3); 4,36 (H-4); 4,42 (H-5); 4,00 (H-6'); 3,87 (H-6).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 62,8 (C-1); 70,9 (C-2); 83,4 (C-3); 85,4 (C-4); 75,1 (C-5); 72,9 (C-6).

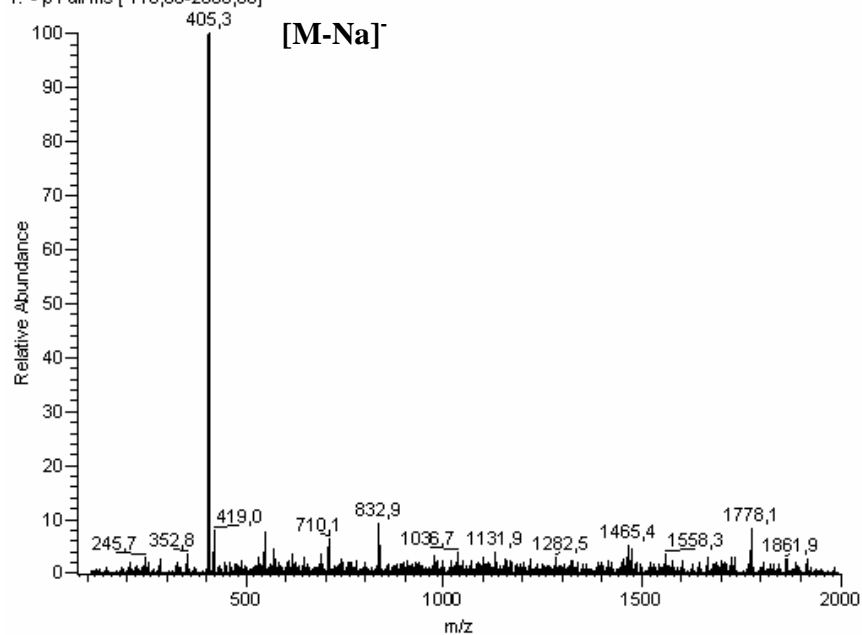
ESIMS:  $m/z$  405  $[\text{M}-\text{Na}]^-$



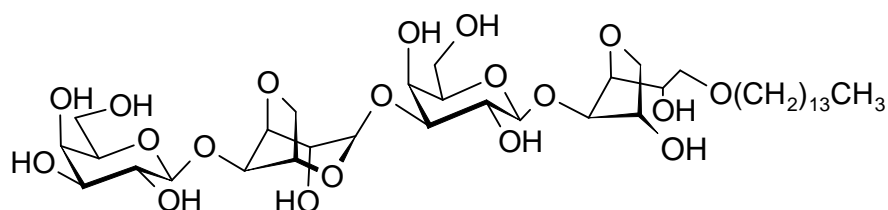
## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **18**



AGR 3S #95-99 RT: 2,81-2,92 AV: 5 NL: 1,23E7  
T: - p Full ms [ 110,00-2000,00]



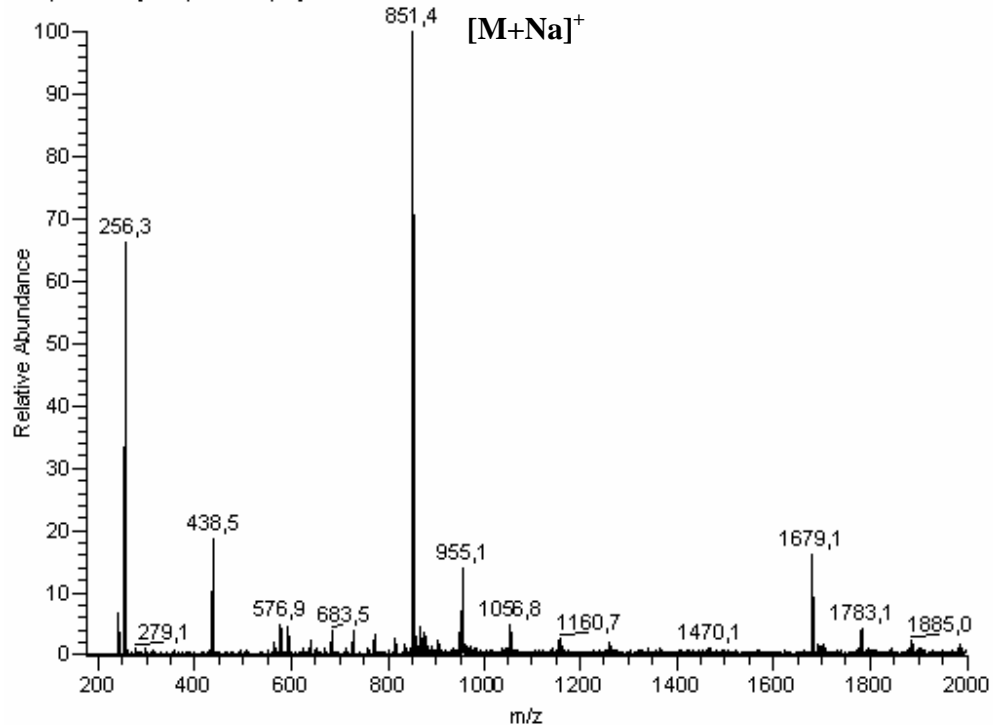
Composto **20** :  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-L-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH



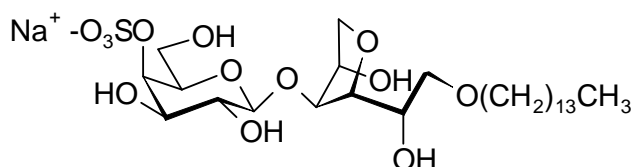
ESIMS:  $m/z$  851  $[M+Na]^+$

Espectros de ESIMS do composto **20**

ALKYL TETRA AGR #43-52 RT: 1,75-2,08 AV: 9 NL: 6,68E6  
T: + p Full ms [ 175,00-2000,00]



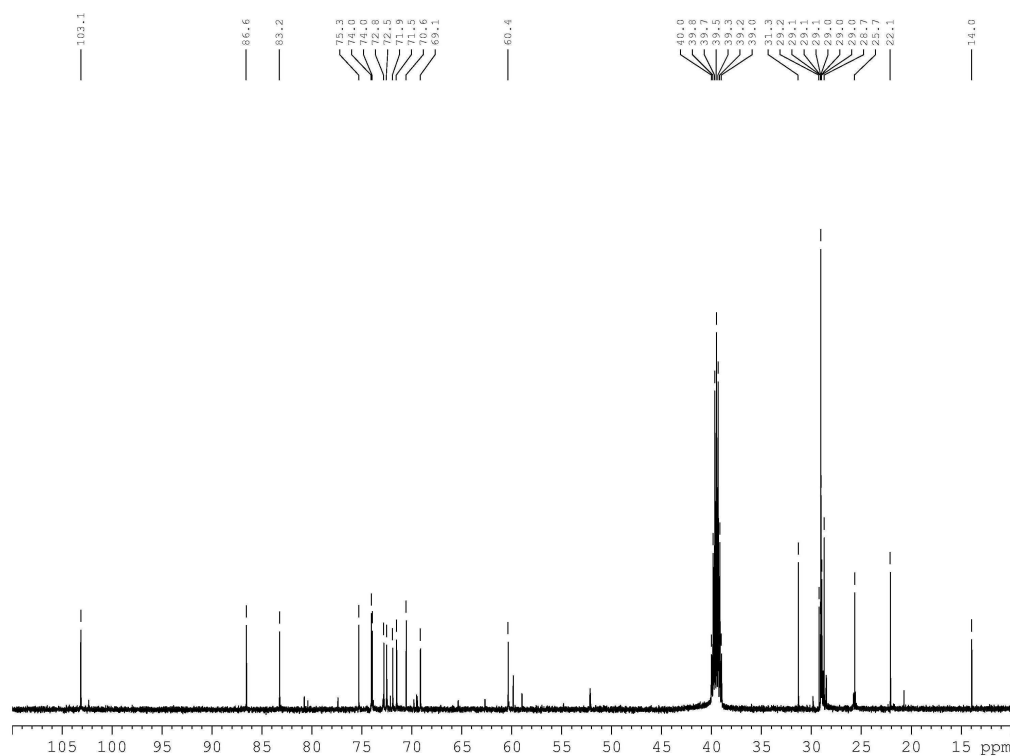
**Composto 22:  $\beta$ -D-Galp 4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-D-GalOH, sal sódico**



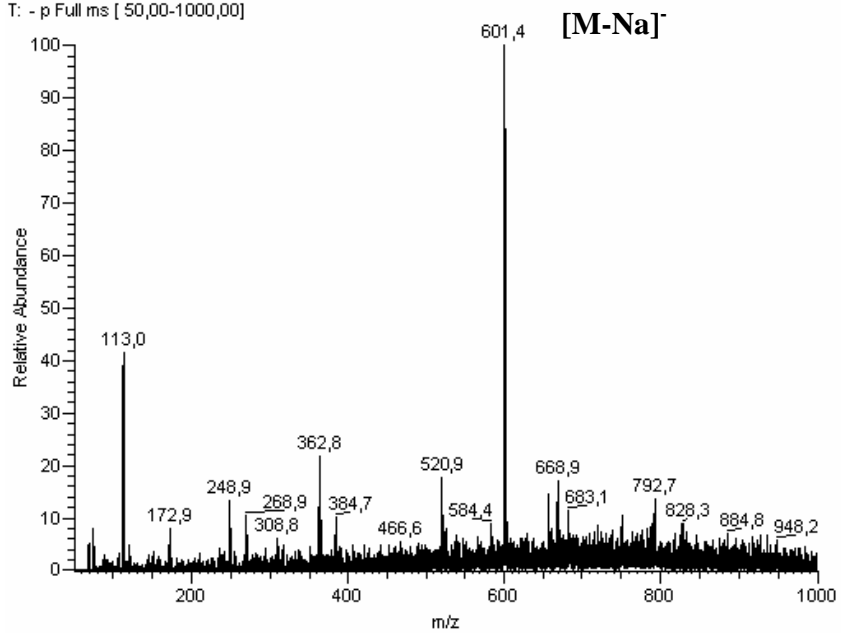
- $\beta$ -D-Galp 4-sulfato:  $^1\text{H}$  (ppm) 4,18 (H-1); 3,20 (H-2); 3,42 (H-3); 4,38 (H-4); 3,56 (H-5); 3,52 (H-6'); 3,48 (H-6).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 103,1 (C-1); 71,5 (C-2); 72,5 (C-3); 74,0 (C-4); 74,0 (C5); 60,4 (C-6).
- 3,6-An-1-O-tetradecil-D-GalOH:  $^1\text{H}$  (ppm) 3,39 e 3,33 (H-1', H-1); 3,69 (H-2); 3,92 (H-3); 4,31 (H-4); 4,16 (H-5); 3,76 (H6'); 3,60 (H-6).  
 $^{13}\text{C}$  (ppm) 71,9 (C-1); 69,1 (C-2); 84,4 (C-3); 86,7 (C-4); 75,3 (C-5); 60,4 (C-6); 32,0-20,0 ( $\text{CH}_2$ ); 14,0 ( $\text{CH}_3$ ).

ESIMS:  $m/z$  601  $[\text{M}-\text{Na}]^-$

## Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e ESIMS do composto **22**



CAR S4 FO-1 #60-64 RT: 1,53-1,63 AV: 5 NL: 3,52E5  
T: - p Full ms [ 50,00-1000,00]



## **ANEXO 3**

**Avaliação do Prof. Dr. Bruce Grindley (orientador no exterior) referentes as atividades realizadas no Departamento de Química da Dalhousie University.**

**DALHOUSIE  
UNIVERSITY***Inspiring Minds**Faculty of Science*

Email: Bruce.Grindley@Dal.Ca

February 24, 2005

To whom it may concern,

Alan Guilherme Gonçalves spent one year doing research in my laboratory as part of his PhD program at the Federal University of Paraná, in Curitiba, Brazil. He arrived in Halifax on January 7, 2004 and will leave on December 22, 2004. He was supported by a scholarship from the Brazilian Research Agency, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Mr. Gonçalves's undergraduate training was as a biochemist. He had been working to develop antiviral compounds based on sulfated oligosaccharides. For studying literature reports, he realized that adding lipid components to these oligosaccharides would make them more effective. He realized that the only way this could be done regioselectively was by means of the organotin intermediates that had been studied extensively in my laboratory. He then arranged to spend the year in my laboratory by being awarded a Brazilian scholarship.

When he came to my laboratory, he had no experience in non-aqueous chemistry, let alone experience with moisture sensitive compounds. He quickly learned to operate effectively in non-aqueous media and developed conditions under which long chain ethers could be introduced regioselectively via organotin intermediates. He also quickly became a competent operator of our new Avance 500 NMR spectrometer. At the same time as he was developing the methodology for ether synthesis, he studied the intermediates in these reactions using multinuclear ( $^{119}\text{Sn}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^1\text{H}$ , and  $^{13}\text{C}$ ) NMR spectroscopy and showed that some long held assumptions about the structures of the intermediates present in solution were wrong. He then moved on to synthesize long chain ethers from disaccharides and trisaccharides regioselectively and also showed that sulfates could also be added regioselectively. We are in the process of writing up one paper on his work that will be sent to a major journal (JACS) and a second will also be written.

I have been very impressed by his initiative, drive, and intelligence in conceiving and setting up this project and in making it happen. These qualities are evident in the laboratory where he has made enormous progress in areas that were foreign to him. He has also been a mature influence in my laboratory that during this year contained some difficult personalities. Although English is not his first language, through the year he progressed from being barely understandable to being reasonably fluent. He has written both experimental and introductory sections of papers acceptably.

DALHOUSIE  
UNIVERSITY

*Inspiring Minds*

I have had seven students complete PhDs with me and another is just finishing. Some of these students were winners of major Canadian Scholarships. One is now the Director of Research at a pharmaceutical company in Montreal. I would rank Mr. Gonçalves with the best of these students in terms of initiative, productivity, and ability to get things done. He is clearly an outstanding student.

Yours sincerely,

*T. B. Grindley*

T. B. Grindley,  
Professor of Chemistry,  
Dalhousie University

Department of Chemistry  
6011 University Avenue  
Halifax, Nova Scotia  
B3H 3J5  
Phone (902) 494-1310  
Fax (902) 494-1310

Ad To:

Mr. Allan Gonçalves

Department of Biochemistry  
902-494-2042

To:

T. B. Grindley  
902-494-2042

RECEIVED:

## **ANEXO 4**

**Produção científica durante o período de realização das atividades de  
Doutorado.**



## RESUMOS EM CONGRESSOS NACIONAIS

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., RMN em 2D combinada com ESI-MS como ferramentas para determinação estrutural de dissacarídeos alditóis obtidos de polissacarídeos de algas vermelhas. **IX Reunião Brasileira de Ficologia, Santa Cruz / Aracruz – Espírito Santo, 02 a 06 de março de 2002.** Resumos, p. 83.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., Electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) analysis for structural determination of oligosaccharide alditols. **XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Caxambu – Minas Gerais, 18 a 21 de maio de 2002.** Programa e Resumos, p. 153 (M-57).

DUCATTI, D. R. B.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., Sulfated oligosaccharide alditols obtained by partial reductive hydrolysis of galactans from a red seaweed. **XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Caxambu – Minas Gerais, 18 a 21 de maio de 2002.** Programa e Resumos, p. 153 (M-58).

GONÇALVES, A. G. ; DUCATTI, D. R. B. ; DUARTE, M. E. R. ; NOSEDA, M. D., Separation and indirect UV detection of oligosaccharides alditols by capillary electrophoresis. **XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Caxambu – Minas Gerais, 17 a 20 de maio de 2003.** Programas e Resumos, p. 160-160.

VIANA, A. G. ; GONÇALVES, A. G. ; CESPEDDES E. G. K. ; DUARTE, M. E. R. ; NOSEDA, M. D., Xylans from the algae *Galaxaura obtusata* and *Tryblionella fragilis* (Rhodophyta). **XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Caxambu – Minas Gerais, 17 a 20 de maio de 2003.** Programas e Resumos, p. 160-160.

GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., Polissacarídeos solúveis extraídos de *Codium decortatum* (Woodw.) M. Howe (Codiales, Chlorophyta). **X Reunião Brasileira de Ficologia, Salvador – Bahia, 25 a 29 de abril de 2004.** Resumos, p. 70-70.

VIANA, A. G.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., Xilanas isoladas a partir de algas marinhas pertencentes a ordem Rhodophyta. **X Reunião Brasileira de Ficologia, Salvador – Bahia, 25 a 29 de abril de 2004.** Resumos, p. 70-70.

PARANHA, R. G.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R. ; NOSEDA, M. D., Capillary Electrophoresis, a powerful analytical technique in polysaccharides partial hydrolysis studies. **XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Caxambu – Minas Gerais, 15 a 18 de maio de 2004.** Programas e Índices, p. 69-69.

DUCATTI, D. R. B.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R. ; NOSEDA, M. D., Pyruvated carrageenan from *Euchema denticulatum*. **XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Caxambu – Minas Gerais, 15 a 18 de maio de 2004.** Programas e Índices, p. 70-70.

PARANHA, R. G.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R. ; NOSEDA, M. D., Analysis of oligosaccharides from agarans and carrageenans by capillary electrophoresis. **XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Águas de Lindóia – São Paulo, 2 a 5 de julho de 2005.** Resumo aceito.

GONÇALVES, A. G. ; GRINDLEY, T. B. ; DUARTE, M. E. R. ; NOSEDA, M. D., Preparation of an agaran-derived 3-O-sulfated disaccharide alditol. **XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Águas de Lindóia – São Paulo, 2 a 5 de julho de 2005.** Resumo aceito.

## RESUMOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS.

GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B.; NOSEDA, M. D., Sulfated and pyruvylated oligosaccharide obtained from the polysaccharides of a red seaweed galactan. **11<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Lisboa - Portugal, September 02-07, 2001.** Book of Abstracts, p. 320.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., Oligosaccharide alditols from galactans of red seaweeds: electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) analysis. **XXI International Carbohydrate Symposium, Cairns – Australia, July 07-12, 2002.** CD of Abstracts, PP048.

NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B. ; DUARTE, M. E. R. . Capillary Electrophoresis: separation and indirect UV detection of sulfated oligosaccharides alditols. **The 39th IUPAC Congress and The 86th Conference of The Canadian Society for Chemistry – Ottawa – Canadá, 2003, Ottawa. Chemistry at the Interfaces, 2003.** p. 190-191.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; ORSATO, A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., Borate-based capillary electrophoresis separation for positional isomers of sulfated oligosaccharides. **13<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Bratislava - Slovakia, August 21-26, 2005.** Resumo aceito.

## ARTIGOS

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. **Carbohydr. Res.**, 337: 2443-2453, **2002**.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO A. S., The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Res.**, 339: 335-347, **2004**.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; PARANHA, R. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. **Carbohydr. Res.**, 340: 2123-2134, **2005**.

GONÇALVES, A. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; GRINDLEY, T. B., Regioselective synthesis of long-chain ethers and their sulfates from methyl *beta*-D-galactopyranoside and derivatives via dibutylstannylene acetal intermediates. **Carbohydr. Res.**, **2005**, *in press*.